

# 慢性活動性肝炎患者末梢血リンパ球と培養肝細胞とのin vitro interactionに関する電顕的観察

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/2297/8911">http://hdl.handle.net/2297/8911</a>

# 慢性活動性肝炎患者末梢血リンパ球と培養肝細胞との in vitro interaction に関する電顕的観察

金沢大学医学部病理学第二講座 (主任: 太田五六教授)

狩 野 哲 次

(昭和56年4月1日受付)

**Key word** 培養肝細胞, 直接細胞障害超微像, point contact, NK

肝炎の慢性化機序については、肝細胞膜を中心とした細胞性免疫の関与が強く示唆され、慢性活動性肝炎 (CAH) の肝組織にみられる piecemeal necrosis, すなわちグリソン鞘内の著明なリンパ球浸潤と小葉辺縁の持続する肝細胞崩壊像がその典型と考えられてきた。電顕上でも<sup>1)2)</sup>リンパ球が接着している肝細胞に種々の変性を示す変化が観察されるなど、障害肝細胞と隣接リンパ球との間の interaction によって起こる肝細胞崩壊が注目を浴びている。他方、最近の in vitro の研究では、慢性肝炎患者のリンパ球を effector 細胞とし、自己肝細胞、ウサギ肝細胞、ラット肝細胞や Chang cell 等を標的細胞として免疫学的な細胞障害性を検討した研究が報告され、<sup>3)-5)</sup>教室の新谷<sup>6)</sup>もラット肝細胞由来の Coon 細胞を標的細胞として検索し、慢性肝炎患者のうち CAH 患者末梢血リンパ球に肝細胞障害性があることを報告している。しかし、これら in vitro における細胞障害性リンパ球と標的肝細胞との interaction を形態学的に検索した報告はほとんどみられない。今回の実験は、CAH 患者のリンパ球中どの亜分画が肝細胞障害に関与しているかを検討すると同時に、その亜分画と標的細胞との間にかなる interaction が超微形態学的にみられるかを併せて検索したのでここに報告する。

## 対象と方法

### I. 対象

肝生検および血清生化学的検査から CAH と診断し

た患者 46 例の末梢血リンパ球を対象とした。なお対照には肝炎の既往のない健常者 12 例の末梢血リンパ球を用いた。

### II. 方法

1. 標的細胞: 1968 年 Coon<sup>7)</sup>により株化された成熟ラット肝細胞株 (Coon 細胞) を用いた。培養液の組成はグルタミン加 MEM (GIBCO. USA), 10% 不活化牛胎児血清 (FCS: GIBCO. USA), Pc 100  $\mu$ /ml, SM 100  $\mu$ g/ml である。

### 2. リンパ球分離

1) whole lymphocyte (WL) の分離; Böyum<sup>8)</sup>の方法に準じて、ヘパリン加末梢血を同量の Hanks balanced salt solution (HBSS) と混和し、Ficoll-Paque (Pharmacia Fine Chemicals, Sweden) に重層し、400  $\times$  g 35 分遠心して得た界面の細胞成分を分離採取し、WL とした。

2) 羊赤血球ロゼット形成細胞 (E-RFC) と非羊赤血球ロゼット形成細胞 (non E-RFC) の分離; Yata<sup>9)</sup>の方法に準じて、羊赤血球 (SRBC) と WL とでロゼット形成を行ったのち、Ficoll-Paque に重層させ、4℃で 400  $\times$  g 30 分遠心分離した。遠心管の底部より採取した細胞成分を E-RFC とし、界面より分離採取した細胞成分を non E-RFC とした。なお E-RFC および non E-RFC は 0.83% NH<sub>4</sub>Cl 20 mM Tris 緩衝液 pH 7.4 で SRBC を完全溶血させ使用した。

3) 7S 抗体感作羊赤血球 (EA) ロゼット形成細胞 (EA-RFC) と非 EA ロゼット形成細胞 (non EA-RFC) の分

Ultrastructural Observations of *In Vitro* Interactions between cultured Rat Liver Cells and Peripheral Blood Lymphocytes from Patients with Chronic Active Hepatitis. **Tetsuji Karino**, Department of Pathology (II), (Director: Prof. G. Ohta), School of Medicine, Kanazawa University.

離； Parish ら<sup>10)</sup>の方法に準じて、まず 7S 抗 SRBC 抗体を用いて感作 SRBC (EA) を作製し、ついで EA と WL でロゼット形成を行い、Ficoll-paque で比重遠心して、前述のごとく EA-RFC と non EA-RFC に分離した。

4) 19S 抗体・補体感作羊赤血球 (EAC) ロゼット形成細胞 (EAC-RFC) と非 EAC ロゼット形成細胞 (non EAC-RFC) の分離； Parish ら<sup>10)</sup>の方法に準じて、まず 19S 抗 SRBC 抗体を用いて EA を作製し、ついで EA と C3H マウス血清を用いて感作赤血球 (EAC) を作製し、WL とロゼット形成させた後 Ficoll-Paque で比重遠心し、EAC-RFC, non EAC-RFC を分離した。なお 7S 抗 SRBC 抗体および 19S 抗 SRBC 抗体は、西岡<sup>11)</sup>の方法で抗 SRBC 家兔血清を作製し、硫酸分画法<sup>12)</sup>およびゲル濾過法<sup>13)</sup>により IgG および IgM 分画を採取し、IgG はさらに DEAE cellulose chromatography<sup>14)</sup>で精製し、得られた IgG および IgM 分画をそれぞれ 7S 抗 SRBC 抗体および 19S 抗 SRBC 抗体とした。

3. リンパ球の直接細胞障害性 (DCC) の検出； CAH 患者 28 例と健常者 7 例を対象とし、Takasugi-Klein<sup>15)</sup>の方法に準じた microcytotoxicity assay 法を用いた。すなわち、マイクロプレート (Falcon, No. 3434, USA) の小孔に Coon 細胞を約 100 個づつ散布し、この Coon 細胞にリンパ球を 1:300 の比で加え 48 時間培養後、マイクロプレートを 2 時間倒立させ、小孔を洗浄した後エタノール固定し、ギムザ染色を行った。リンパ球の肝細胞障害性の測定はマイクロプレートの小孔に生着している標的細胞を算定し、リンパ球無添加コントロールと比較し、減少率を百分率で求めた。

% cytotoxicity =

$$100 - \frac{\text{リンパ球添加小孔の平均標的細胞数}}{\text{リンパ球無添加小孔の平均標的細胞数}} \times 100$$

#### 4. 標的細胞接着リンパ球亜分画の測定

1) ロゼット形成法による亜分画の測定；標的 Coon 細胞を培養スライド (Lab-Tex, No. 4838, USA) にてあらかじめ 12 時間培養した後、前述のように分離した WL を 1:75 ~ 150 の比で添加した。6 ~ 12 時間混合培養した後、培養スライドを転倒してさらに 1 時間培養した。ついで培養液を除去後 SRBC (E) を  $0.75 \text{ ml}$  ( $4.5 \times 10^7 / \text{ml}$  FCS) を加え  $37^\circ\text{C}$  15 分間培養した。さらに  $4^\circ\text{C}$  で 30 分間反応させた後、15 分間培養スライドを再び転倒させ未反応 E を除き、洗浄後 2.5% グルタルアルデヒド ( $0.01 \text{ M}$  リン酸緩衝液 pH 7.2) で固定しギムザ染色した。同様に EA および EAC 浮遊液

を MEM にて作製し、培養スライドに加えてそれぞれ  $37^\circ\text{C}$  30 分間および 20 分間培養後洗浄、固定、染色した。SRBC 3 個以上からなるロゼット形成リンパ球を陽性細胞として、標的細胞に接着しているリンパ球のうち陽性細胞の占める割合を百分率で表わした。

2) ペルオキシダーゼ抗体法による亜分画の測定；前述したロゼット形成法の場合と同様に、WL を培養スライドに加え肝細胞と混合培養した。培養後家兔 aggregated IgG  $200 \mu\text{g}/\text{ml}$  MEM で  $37^\circ\text{C}$  45 分間前処置し、ついで periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP) 液<sup>16)</sup>で  $4^\circ\text{C}$  で 60 分間固定した。つぎにペルオキシダーゼ標識抗家兔 IgG ヤギ抗体 (富士臓器) と室温で 30 分間反応させ、洗浄後、0.005% 過酸化水素加ジアミノベンチジン (DAB) 溶液と室温で 5 ~ 10 分間反応させた。洗浄後ヘマトキシリンで核染色を行ない、脱水置換後封入し顕微鏡にて観察し、標的細胞に接着しているリンパ球のうち、ペルオキシダーゼ陽性細胞の占める割合を算定した。さらに本実験の標的細胞接着リンパ球のうち、内因性ペルオキシダーゼ陽性細胞の割合を調べる目的で培養スライドの試料の一部を培養後ただちに PLP 液で固定し、DAB 液と反応させ核染色後鏡検した。なお家兔 aggregated IgG は家兔血清 (日本バイオテスト) から硫酸分画法<sup>12)</sup>およびゲル濾過法<sup>13)</sup>によって IgG 分画を採取し、Hallberg<sup>17)</sup>の方法に従って aggregated IgG を作製した。

5. 末梢血リンパ球 non E-RFC の亜分画の測定；橋ら<sup>18)</sup>の微量測定法に従い、前記 SRBC, EA, EAC のそれぞれと CAH 患者 non E-RFC とを反応させ、3 個以上の羊赤血球とロゼットを形成するそれぞれのリンパ球を各ロゼット形成陽性細胞とし、それらの全リンパ球中に占める比率を算定した。また、試料の一部を家兔 aggregated IgG で前処置後、ペルオキシダーゼ標識抗家兔 IgG ヤギ抗体と反応させ、ペルオキシダーゼ陽性細胞の全リンパ球中に占める比率を算定した。

6. 電顕的観察；CAH 患者 11 例と健常者 4 例を対象とした。小カバーガラス片を入れたプラスチック培養シャーレ (Falcon, No. 3001, USA) にて Coon 細胞を 12 時間培養後、リンパ球を 1:20 ~ 150 の比で添加した。24 時間混合培養した後、シャーレ上の標的細胞 monolayer および混合培養上清中の浮遊標的細胞を透過電顕用に、またシャーレ内の小カバーガラス片を走査電顕用に試料作製した。透過電顕用試料は 2.5% グルタルアルデヒド ( $0.05 \text{ M}$  カコジル酸ソーダ緩衝液 pH 7.3) で  $4^\circ\text{C}$  60 分固定後 1% オスミウム酸 ( $0.05 \text{ M}$  カコジル酸ソーダ緩衝液 pH 7.3) で  $4^\circ\text{C}$  60 分間固定後、脱水し、酸化プロピレンで置換した。置換

した際培養シャーレより遊離した標的細胞 monolayer を集めてエボン 812 に包埋した。超薄切片作製後、酢酸ウラニル、硝酸鉛の二重染色を行ない鏡検した。鏡検上、各例とも、各々違った組み合わせのリンパ球と標的細胞の interaction を 50 以上観察した。また走査電顕用試料の小カバーガラス片は透過電顕用試料と同様に二重固定し、脱水し、酢酸イソアミルで置換後臨界点乾燥を行ない、白金パラジウムで金属蒸着した後に鏡検した。

### 成 績

1. 培養肝細胞障害リンパ球の亜分画: microcytotoxicity assay による DCC の結果を Table 1 に示した。健常者リンパ球の % cytotoxicity の平均値 + 2SD 以上を細胞障害性陽性とする、CAH 患者の non E-RFC 分画では 28 例中 26 例が、EA-RFC 分画では 10 例中 4 例が DCC 陽性であり、この 2 つの分画が健常者に較べて有意に細胞障害性の陽性頻度が高かった ( $P < 0.001$  および  $P < 0.01$ )。また、EAC-RFC 分画の DCC は 10 例中 3 例が陽性であり、前の 2 分画に較べて陽性頻度が低いけれども、健常者に比して高い傾向にあった。他方、E-RFC 分画では 16 例中 1 例のみが陽性で、non EA-RFC および non EAC-RFC 分画では 1 例も陽性例がみられなかった。つぎに、標的細胞接着リンパ球の亜分画をロゼット

形成法 (Fig. 1) およびペルオキシダーゼ抗体法にて検討した結果を Table 2 に示した。non E-RFC が接着リンパ球の 81% を占め、つぎに EAC-RFC が 62% であり、EA-RFC は 17% であった。Fc リセプター陽性細胞を aggregated IgG を用いて染色した成績と EA-RFC の成績とは必ずしも一致しなかった。

ここで末梢血リンパ球の % cytotoxicity のもっとも高かった CAH 患者 non E-RFC がいかなる亜分画から成るかをロゼット形成法、ペルオキシダーゼ抗体法で検討したが、結果は Table 3 のごとくで、先の細胞障害性を示す分画では、EAC-RFC が全体の 41% を占め、EA-RFC が全体の 32% を占め、多種類の亜分画より成っていた。そこで、CAH 患者 non E-RFC 添加時の標的細胞接着リンパ球の亜分画を検討したが、結果は Table 4 のごとくで EAC-RFC が全体の 58% と最も高かったが、前述した末梢血 non E-RFC の亜分画の結果と同様に多種類の亜分画が同じような分布で標的細胞に接着していた。

2. 培養肝細胞障害リンパ球と標的細胞との interaction の電顕的観察; 標的細胞に用いた monolayer の Coon 細胞は走査電顕ではなだらかに盛り上がった多角形の細胞で、その遊離面には microvilli がみられる (Fig. 2)。透過電顕では小管状の粗面小胞体と楕円形のミトコンドリアおよび核周囲にゴルジ装置を認めるが、概して細胞小器官にとぼしい (Fig. 3)。この標的細胞の monolayer に CAH 患

Table 1. Results of direct lymphocyte cytotoxicity against cultured rat liver cells (Coon cells) by various lymphocyte subsets from patients with chronic active hepatitis (CAH) and from normal controls.\*

Subject	Lymphocyte subsets					
	E-RFC	non E-RFC	EA-RFC	non EA-RFC	EAC-RFC	non EAC-RFC
CAH	-1.2±25.8	44.9±16.5**	53.6±19.2**	-29.2±13.5	15.3±25.4	-26.0±12.4
	(16)	(28)	(10)	(10)	(10)	(10)
	[1/16]	[16/28]	[4/10]	[0/10]	[3/10]	[0/10]
Normal	-8.4±15.9	16.8±4.4	17.8±24.5	-20.6±10.7	0.18±14.9	-15.9±18.7
	(5)	(5)	(7)	(7)	(7)	(7)

\*The data represent mean ± standard deviation. E-RFC: sheep erythrocyte rosette-forming cells. EA-RFC: 7S antibody-sensitized sheep erythrocyte rosette-forming cells. EAC-RFC: 19S antibody-and complement-sensitized sheep erythrocyte rosette-forming cells. ( ): number of cases studied. [ ]: number of cases with significant cytotoxicity per patients studied. Statistically significant in comparison with normal controls, \*\* $P < 0.001$ , \*\*\* $P < 0.01$ .

Table 2. Lymphocyte subsets attached to target Coon cells after incubation of target cells with whole lymphocytes from patients with CAH for 6 hr at 37° C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO<sub>2</sub>.

Lymphocyte subsets	Mean ± SD %
non E-RFC : E-RFC	81.2 ± 0.9 : 18.8 ± 0.9 (3)
EA-RFC : non EA-RFC	16.8 ± 4.3 : 83.2 ± 4.3 (7)
EAC-RFC : non EAC-RFC	61.9 ± 6.3 : 38.1 ± 6.3 (5)
Fc-receptor bearing cell*	37.5 ± 1.9** (3)
endogenous-peroxidase-positive cell	5.9 ± 1.2 (4)

( ): number of cases studied. \*Fc-receptor-bearing cells were assayed by means of peroxidase-labelled antibody method after treatment of lymphocytes with aggregated IgG. \*\*endogenous-peroxidase-positive cell: less than 7% (5.3 ± 1.4%). Abbreviations are the same as in Table 1.

Table 3. Lymphocyte subsets of non E-RFCs from patients with CAH.

Lymphocyte subsets	Mean ± SD %
E-RFC : non E-RFC	12.4 ± 2.9 : 87.6 ± 2.9 (4)
EA-RFC : non EA-RFC	31.9 ± 2.7 : 68.1 ± 2.7 (3)
EAC-RFC : non EAC-RFC	40.7 ± 4.6 : 59.3 ± 4.6 (4)
Fc-receptor-bearing cell**	29.4 ± 3.6** (3)
endogenous-peroxidase-positive cell	6.4 ± 2.4 (4)

( ): number of cases studied. \*Fc-receptor-bearing cells were assayed by means of peroxidase-labelled antibody method after treatment of lymphocytes with aggregated IgG. \*\*endogenous-peroxidase-positive cell: less than 9% (6.2 ± 2.5%). Abbreviations are the same as in Table 1.

Table 4. Lymphocyte subsets attached to target Coon cells after incubation of target cells with non E-RFCs from patients with CAH for 6 hr 37°C in a humidified atmosphere.

Lymphocyte subsets	Mean $\pm$ SD %
E-RFC : non E-RFC	19.4 $\pm$ 8.8 : 80.6 $\pm$ 8.8 (5)
EA-RFC : non EA-RFC	42.2 $\pm$ 15.5 : 57.6 $\pm$ 15.5 (5)
EAC-RFC : non EAC-RFC	58.2 $\pm$ 10.0 : 41.8 $\pm$ 10.0 (5)
Fc-receptor-bearing cell*	37.6 $\pm$ 3.2** (2)
endogenous-peroxidase-positive cell	7.9 $\pm$ 1.9 (3)

( ): number of cases studied. \*Fc-receptor-bearing cells were assayed by means of peroxidase-labelled antibody method after treatment of lymphocytes with aggregated IgG. \*\*endogenous-peroxidase-positive cell: less than 10% (7.6  $\pm$  2.3%). Abbreviations are the same as in Table 1.

者 non E-RFCを加えて24時間培養したものを観察した。走査電顕では、non E-RFCが標的細胞に多数接着し (Fig. 4a), 標的細胞は不整形に萎縮したり (Fig. 4b), 紡錘形に変形したものが観察された。変形標的細胞は、標的細胞数に対する添加リンパ球数を増大するにつれて多く認められるようになり、接着リンパ球数が多いほど標的細胞の変形が強くなる傾向があった。透過電顕下では、non E-RFCの接着した標的細胞の原形質には種々の変化を認めた。すなわち ① ゴルジ装置周辺の小空胞の増加 (Fig. 5a), ② 粗面小胞体の開大 (Fig. 5b), ③ autophagic vacuoleの増加 (Fig. 5c), ④ 原形質内の局所の崩壊像 (Fig. 5d) とその segregation (Fig. 5e), defecation (Fig. 5e), ⑤ 核の形の不整形などである。さらに特徴的な所見として、原形質内に大小の不整形の空胞が形成され、その壁から空胞に向かって大小の絨毛状の突出が多数認められた (Fig. 5f)。時には、多数の絨毛様構造物で内腔が充満している巨大空胞として観察されるものもあった (Fig. 5g)。この空胞には正常な粗面小胞体からの移行像も認められた (Fig. 5h)。ちなみに Fig. 6, 7 はそれぞれ EA-RFC および aggregated IgG を用いた Fc リセプタ陽性細胞が標的細胞に接着している透過電顕像であるが、その標的細胞には non E-RFC 添加

の場合にみられたものと同様の変化像が観察された。つぎに、標的細胞 monolayer に CAH 患者の E-RFC を加えて 24 時間培養した場合、走査電顕では少数の E-RFC が標的細胞の遊離面に接着しているのみで標的細胞の変化はきわめてとぼしい (Fig. 8)。また透過電顕でも同様であった。

CAH 患者の non E-RFC 添加後 24 時間の培養上清中の浮遊標的細胞をみると、前述の monolayer の標的細胞においてみられた変化に加えて原形質の暗調化を伴った変性の著しい浮遊標的細胞が、non E-RFC の接着した状態で認められた (Fig. 9a)。また一方では崩壊像を示す浮遊標的細胞も観察された (Fig. 9b)。しかし、これらの形態と、リンパ球無添加で Coon 細胞のみを培養した場合の培養上清中の浮遊細胞にみられる形態 (Fig. 10) との間にはかなりの相違が認められた。すなわち、後者の場合は Fig. 10 のごとく主に ① 核の変形と核膜下および核小体への核質の凝集、② ミトコンドリアの膨化とクリスタの破壊、③ 粗面小胞体の囊状の拡大、④ 種々の大きさの空胞の出現、⑤ 原形質内の膜性小器官にとぼしい area の出現などであり、CAH 患者 non E-RFC が接着した標的細胞にみられる絨毛様構造物で充満した空胞はみられなかった。

non E-RFC の標的細胞への接着様式をみると以下の3型が観察された。すなわち、① 標的細胞の遊離面への接着 (Fig. 11a)、② 隣接する標的細胞の間に割り込むような接着 (Fig. 11b)、③ 培養シャーレ面と標的細胞との間へのもぐり込み (Fig. 11c) である。これを透過電顕でみると、前述したいずれの接着様式でも、両細胞の接着面はお互に波状を呈しており、それぞれの波の頂部で両細胞膜は close contact をしていた (Fig. 12)。この close contact 部の両細胞膜間腔はおよそ 150 Å 以下であり、その長さが 1500 Å 以下のいわゆる point contact であった。さらに接着部位によっては、両細胞膜が癒合しているかのようにみえる部位も認められたが (Fig. 13a)、goniometer により試料に適当な傾斜を与えてその部を観察すると、100 Å 以下のわずかの細胞間腔が認められ (Fig. 13b)、両細胞膜の癒合はなく、また明らかな原形質間架橋形成もみられなかった。ただし 100 Å 以下に狭くなった細胞間腔にはフィラメント様の構造物が認められ、両細胞膜のより緻密な point contact を示していた (Fig. 13b)。一方、少数ではあるが両細胞膜が、interdigitation の状態で接着しているのがみられたが (Fig. 14)、そのところどころに point contact が観察された。

3. 健常者 non E-RFC と標的細胞との interaction の電顕的観察; 標的細胞 monolayer に健常者末梢血 non E-RFC を加えて 24 時間培養した場合、走査電顕では CAH 患者 non E-RFC 添加の場合に較べて本質的な相違はみられなかった。すなわち、かなり多数の non E-RFC が標的細胞に接着しており、CAH 患者 non E-RFC 添加時にみられたと同様に、変形した標的細胞もみられたが、その数は少なかった (Fig. 15)。透過電顕上、少数の標的細胞には CAH 患者 non E-RFC 添加の場合にみられたものと同様の絨毛様突出物を内腔に有する空胞を認めたが (Fig. 16)、リンパ球の接着にもかかわらず、このような変化を示すものが少ないという印象を得た。また、non E-RFC の標的細胞への接着様式や接着部の超微細構造においても、CAH 患者 non E-RFC 添加の場合にみられたものと本質的な相違は認められなかった。

## 考 察

1. CAH 患者における培養肝細胞障害リンパ球の亜分画と細胞障害: 従来の *in vitro* の研究においては、肝細胞障害性を有する CAH 患者リンパ球の亜分画が、C<sub>3</sub> リセプタを有する亜分画であるとするもの<sup>5)</sup>、Fc リセプタを有する亜分画であるとするもの<sup>6)</sup>、ある

いは表面免疫グロブリンや羊赤血球リセプタのいずれももたない null cell であるとするもの<sup>19)</sup>など、用いる標的細胞の種類やリンパ球分離法の相違もあり、一定の見解に達していない。しかし今回の microcytotoxicity test では、non E-RFC、EA-RFC の両分画に強い細胞障害性を認め、EAC-RFC 分画も軽度の障害性を示した。さらに、電顕的観察から後述のごとく、標的細胞への接着がリンパ球の細胞障害の必要条件であるとの結論が得られたため、今回、培養肝細胞に接着しているリンパ球の亜分画を検討した。まず、WL を標的細胞に添加した場合、E-RFC と non E-RFC についてみれば、細胞障害性の強い non E-RFC の方がはるかに多く標的細胞に接着していることがわかった。そこで末梢血中の non E-RFC の亜分画をみると、EA-RFC、EAC-RFC の順序でその % が増加しており、この成績と標的細胞接着 non E-RFC の亜分画の成績とを比較すると、本質的な相違がなく、特定の亜分画に偏って標的細胞に接着していることなく、多種類の亜分画が接着していた。もし標的細胞に接着しているすべてのリンパ球が細胞障害性を発揮するとすれば、本実験系での細胞障害機序は、従来言われていたような単一機序 (ADCC あるいは natural killing) ではなく、より複雑な機序の協同作用となろうが、細胞障害性リンパ球の亜分画が限定されていることと実験系が単純であることから、次のいくつかの機序が問題となる。まずリンパ球が CAH 患者からのものであり、肝細胞膜抗原によって既に感作された状態にある B-rich 分画に強い細胞障害性を認めることから、第 1 に培養時間中に B-rich 分画から分泌される肝細胞膜抗体が本反応に関与している可能性が考えられる。そしてヒトとラットの肝細胞膜抗原には共通抗原があることもよく知られている事実である。第 2 に膜抗原と膜抗体との免疫複合体が生体内で形成され、それをリンパ球が持ち込み、培養時間中に培地内で抗原と抗体がはざれて、抗体が標的細胞膜と複合して複合体を介して antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) を起し得る可能性もあろう。一方、第 3 として、生体内でリンパ球が肝細胞膜に感作されていない場合には、natural killing (NK) による反応<sup>20)-22)</sup>、即ち NK 細胞が本反応を主導している可能性が考えられる。この反応は、健常者リンパ球 (non E-RFC) を用いた実験においてはとくに高い可能性をもっている。逆に否定できる反応としては、肝細胞膜に感作された T 細胞による反応 (immune T cell-mediated cytotoxicity) や感作 T 細胞から分泌される lymphokine-mediated cytotoxicity は否定してよ

く、E-RFC 分画に細胞障害性がないことから裏付けされる。ところで、前述の第1、第2のADCC反応や第3のNK反応は、ともにFcリセプタをもつ細胞が主役を演じており、non E-RFC分画中に比較的多数含まれている。

2. Non E-RFCと標的細胞とのinteraction: リンパ球が標的細胞を障害するためには、両細胞のcontactが必要であると言われてきた<sup>23)-26)(29)-31)</sup>。それらの実験には、従来T細胞を用いたものが多く、本実験のようにCAH患者のnon E-RFCをeffector細胞とし、肝細胞を標的細胞とした報告がない。non E-RFCの接着している標的細胞にみられた特異な変化として、絨毛様構造を多数内腔にもった大型空胞の出現があった。この空胞は、種々の形状の観察から、最初は粗面小胞体の開大から出発して、それらの拡大癒合によって不整形空胞となり、その内腔が一段と拡大して大型空胞に転化するものと考えられ、空胞は単層の限界膜でへだてられている。空胞の内腔に突出している絨毛様構造物内には、細胞小器官を含み、大小不同の絨毛から、ほぼ均一な大きさの小型絨毛を含むものまでである。このような大型空胞を含む細胞の原形質には、autophagic vacuoleや無定型物質その他を含む局所的な崩壊像がみられ、退行変性像が著しい。in vitroのcytotoxicity反応で、標的細胞にこのような変化を記載した報告はまだない。Danielsら<sup>27)</sup>は、ごく最近、抗herpes simplex virus抗体で前処置した同ウイルス感染ヒトfibroblastを標的細胞とし、同じウイルス感染患者リンパ球を用いてADCCの透過および走査電顕像を示しているが、前記の大型空胞出現の記載がなく、リンパ球に接して微細空胞の多数出現のみを報告している。今回のDCCとADCCの違いか、ヒトfibroblastとラット肝細胞の違いによるのかは不明である。一方、in vivoの実験では、粗面小胞体由来する特異な大型空胞に類似した所見が、渡辺ら<sup>28)</sup>のエチオン投与による細胞障害の実験においてラットの膝で観察されており、蛋白合成の障害に伴う退行変性的性格をもつ粗面小胞体の変化と意義づけている。

大型あるいは不整形空胞をもつ標的細胞の出現は、対照として用いた健常者からのnon E-RFCと標的細胞との反応の時にも見られた。もし大型空胞の出現がADCCには認められず、また今回の実験でCAHのnon E-RFC添加の場合も健常者のその場合も、大型空胞の出現という点から、同一の作用機序による標的細胞の変化だと仮定すると、今回の反応はnatural killing反応であろうと理解される。natural killing反応は抗体の関与を必要としないeffector細胞と標

的細胞の直接的反応であるからである。

一方、今回の実験では、monolayerから剥離した変性肝細胞のなかにも、培養シャーレ面に壁着状態にある肝細胞と全く同一の変化(絨毛様構造をもつ大型空胞)が認められた。これに対して標的細胞monolayerを、リンパ球を加えずに自然崩壊を待つ状態で培養すると、その剥離肝細胞の変性像は、前述とは異なり、多発する空胞の内腔には絨毛様突出はほとんど認められなかった。標的細胞のみの培養では、肝細胞が低栄養・低酸素状態に陥ってから剥離崩壊すると考えられるのに対して、リンパ球による免疫学的標的細胞崩壊では、リンパ球との接着を介して、おそらく肝細胞の膜変性が引き金となるのだろうと理解される。いずれにせよ、標的細胞の自然崩壊と細胞免疫学的崩壊が形態学的に異なるという所見は重要だと思われる。

リンパ球と標的細胞との接着は、標的細胞の遊離面への接着のみならず、隣接標的細胞の境界面への割り込み、また培養シャーレ面へのもぐり込みの所見から考えて、リンパ球が標的細胞の周囲を移動しながら接着すると考えてよいであろう。そして、その移動が、リンパ球の細胞障害性を発揮させる機会を著しく増大させるという点で細胞障害に重要であろうと思われる。

リンパ球と標的細胞の接点をみると、150 Å以下のpoint contactが多数認められ、両細胞膜の癒合がみられなかった。Biberfeldら<sup>29)</sup>は両者の膜の近接している長さの長短より、broad zone contactとpoint contactとに分類し、リンパ球がその細胞障害性を発揮するためにはbroad zone contactの方がより適した状態であると推論している。Danielら<sup>27)</sup>も、ADCCではリンパ球とfibroblastとの接着がpoint contactのものとbroad zone contactのものと両者があるとしている。これに対し、Kalinaら<sup>30)</sup>はLeukemia EL 4細胞を標的細胞とし、Tリンパ球を用いた実験において、point contactが接着部位における主な形態であると報告している。本実験では、non E-RFCは多数のpoint contactを介して標的細胞と接着しているのが認められ、broad zone contactをみなかった。point contactの部位では、両者の膜の間には、Kalinaら<sup>30)</sup>がsepta-like structureと言い、Firketら<sup>31)</sup>がthread-like materialと記載した微細なフィラメント構造物の存在は判然としなかったが、無定型な、微細な構造物を認めた。fluid mosaic model説<sup>32)</sup>によると、細胞膜の二重膜構造のうちの外側脂質層の表面にはacidic glucosaminoglycanか



ら成る surface coats の存在が知られている。point contact 部位の、両細胞のこれら surface coats の重なりあるいは接着が、今回、両細胞間の微細な構造物として観察されたのではないかと考えられる。この surface coats は細胞の凝集や接着のみならず細胞相互の情報伝達、免疫応答、物質輸送に重要な役割を果たしているだろうといわれている<sup>33)34)</sup>。本実験で示された point contact によって、両 surface coats を場として免疫応答が行われているものと推測する。

### 結 論

Coon ラット培養肝細胞を標的細胞として CAH 患者末梢血リンパ球と培養し、肝細胞障害に関与するリンパ球の亜分画を検討し、その亜分画と標的細胞との間で起こる interaction と標的細胞の障害過程の形態を電顕的に検討した。

1. CAH 患者において直接肝細胞障害性を有するリンパ球は non E-RFC, EA-RFC, EAC-RFC の順序であり、heterogeneous な population であった。

2. Coon 細胞に接着する non E-RFC の亜分画も 1. と同じく、heterogeneous な population であった。

3. 細胞障害性を有するリンパ球は標的細胞に多数の point contact を介して接着しながら移動することにより、monolayer の標的細胞を変性、遊離させ、cytolysis に陥らせた。

4. 健常者の non E-RFC による細胞障害像と CAH 患者の non E-RFC による細胞障害像との間には超微細構造上、質的差異は認められず、共に絨毛様構造物を含む粗面小胞体由来の大型空泡が原形質内に形成されるという過程を経て崩壊した。

5. この形態変化を基礎として、Coon 細胞に CAH の non E-RFC が直接接着して Coon 細胞を崩壊させるメカニズムと、健常者の non E-RFC が同じく Coon 細胞を崩壊させるメカニズムとはきわめて類似し、おそらく natural killing によるであろうと推論した。

稿を終るに臨み、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました。恩師太田五六教授に深く感謝の意を表すると共に御協力いただいた野々村昭孝教授はじめ第 2 病理学教室の諸先生方に心から感謝いたします。

また貴重な臨床例を提供してくださいました本学第 1 内科服部信教授および肝臓グループの諸先生方と、国立金沢病院内科、杉岡五郎部長および諸先生に感謝いたします。

### 文 献

1) Kawanishi, H. : Morphologic association of

lymphocytes with hepatocytes in chronic liver disease. Arch. Pathol. Lab. Med., 101, 286 - 291(1977).

2) Karasawa, T. & Shikata, T. : Necrosis of the hepatocytes with hepatitis B surface antigen. Occurrence in a chronic hepatitis B surface antigen carrier. Arch. Pathol. Lab. Med., 101, 280 - 285(1977).

3) Thomson, A. D., Cochrane, M. A. G., McFarlane, I. G., Eddleston, A. L. W. F. & Williams, R. : Lymphocyte cytotoxicity to isolated hepatocytes in chronic active hepatitis. Nature (London.), 252, 721 - 722 (1974).

4) Wands, J. R. & Isselbacher, K. J. : Lymphocyte cytotoxicity to autologous liver cells in chronic active hepatitis. Proc. nat. Acad. Sci. USA. 72, 1301 - 1303 (1975).

5) Geubel, A. P., Keller, R. H., Summerskill, W. H. J., Dickson, E. R., Tomasi, T. S. & Shorter, R. G. : Lymphocyte cytotoxicity and inhibition studied with autologous liver cells ; observations in chronic active liver disease and the primary biliary cirrhosis syndrome. Gastroenterology, 71, 450 - 456 (1976).

6) 新谷 寿久:慢性活動性肝炎の肝細胞崩壊機序.十全医会誌, 87, 11 - 21 (1978).

7) Coon, H. G. : Clonal culture of differentiated rat liver cells. J. Cell Biol., 39, 29a. (1968).

8) Boyum, A. : Separation of leucocytes from blood and bone marrow. Scand. J. clin. Lab. Invest., 21, Suppl. 97, 1 - 109 (1968).

9) Yata, J., Desgranges, C., Tachibana, T. & De-The, G. : Separation of human lymphocytes forming spontaneous rosettes with sheep erythrocytes. Biomedicine (express), 19, 475 - 475 (1973).

10) Parish, C. R. & Hayward, J. A. : The lymphocyte surface. I. Relation between Fc receptors, C'3 receptors and surface immunoglobulin. Proc. R. Soc. Lond. B., 187, 47 - 63 (1974).

11) 西岡久寿弥:ヒツジ血球に対する抗体の作り方.蛋白質核酸酵素, 11, 1485 - 1486 (1966).

12) Cohn, E. J., McMeekin, T. L. : Preparation and properties of serum and plasma proteins separating upon equilibration across memb-

ranes with ammonium sulfate solution of controlled pH, ionic strength and temperature. *J. Am. Chem. Soc.*, **62**, 3386-3392 (1940).

13) **Flodin, P. & Killander, J.** : Fractionation of human serum proteins by gel filtration. *Biochem. Biophys. Acta*, **63**, 403-408. (1962).

14) 北川正保: 免疫学・アレルギー学実験法(進藤宙二監修), **1**, 143-165, 東京, 文光堂(1971)

15) **Takasugi, M. & Klein, E.** : A microassay for cell-mediated immunity. *Transplantation*, **9**, 219-227 (1970).

16) **McLean, I. W. & Nakane, P. K.** : Periodate-Lysine-Paraformaldehyde fixative. A new fixative for immunoelectron microscopy. *J. Histochem.*, **22**, 1077-1083 (1974).

17) **Hallberg, T.** : Inhibition of cytotoxicity of nonimmune human lymphocytes for sensitized chicken erythrocytes by aggregated human IgG. *Scand. J. Immunol.*, **3**, 117-120 (1974).

18) 橘武彦, 石川美智子, 中沢真平: ヒト・リンパ球, T細胞, B細胞の微量測定法. 免疫実験操作法Ⅲ. 金沢. 日本免疫学会編: 683-687 (1973).

19) **Kakumu, S., Hara, T., Goji, H. & Sakamoto, N.** : Lymphocyte cytotoxicity against Chang liver cells in chronic active hepatitis. *Cell. Immunol.*, **36**, 46-53 (1978).

20) **Takasugi, M., Mickey, M. R. & Terasaki, P. I.** : Reactivity of lymphocytes from normal persons on cultured tumor cells. *Cancer Res.*, **33**, 2898-2902 (1973).

21) **Rosenberg, E. B., McCoy, J. L., Green, S. S., Donnelly, F. C., Levine, P. H. & Herberman, R. B.** : Destruction of human lymphoid tissue-culture cell lines by human peripheral blood lymphocytes in <sup>51</sup>Cr-release cellular cytotoxicity assays. *Nat. Cancer Inst.*, **52**, 345-352 (1974).

22) **Kiessling, R., Klein, E., Pross, H. & Wigzell, H.** : "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the Killer cell. *Eur. J. Immunol.*, **5**, 117-121 (1975).

23) **Biberfeld, P.** : Cytotoxic interaction of photohemagglutinin-stimulated blood lymphocytes with monolayer cells: A study by light and electron microscopy. *Cell. Immunol.*, **2**, 54

-72 (1971)

24) **Liepins, A., Faanes, R. B., Lifter, J., Choi, Y. S. & De Harven, E.** : Ultrastructural changes during T-lymphocyte-mediated cytolysis. *Cell. Immunol.*, **28**, 109-124 (1977).

25) **Cerottini, J. C. & Brunner, K. T.** : Cell-mediated cytotoxicity, allograft rejection and tumor immunity. *Adv. Immunol.*, **18**, 67-124 (1974).

26) **Perlmann, P. & Holm, G.** : Cytotoxic effects of lymphoid cells in vitro. *Adv. Immunol.*, **11**, 117-164 (1969).

27) **Daniels, C. A., Bodner, S. & Trofatter, K. F.** : Scanning and transmission electron microscopic studies of complement-mediated lysis and antibody-dependent cell-mediated cytolysis of Herpes simplex virus-infected human fibroblasts. *Am. J. Pathol.*, **100**, 663-682 (1980).

28) 渡辺陽之輔・龜谷徹: 粗面小胞体の形態-隣外分泌細胞における粗面小胞体の形態変化について-。細胞生物学シンポジウム, **21**, 99-101 (1970).

29) **Biberfeld, P. & Johansson, A.** : Contact areas of cytotoxic lymphocytes and target cells. An electron microscopic study. *Exp. Cell Res.*, **94**, 79-87 (1975).

30) **Kalina, M. & Berke, G.** : Contact region of cytotoxic T lymphocyte-target cell conjugates. *Cell. Immunol.*, **25**, 41-51 (1976)

31) **Firket, H. & Degiovanni, G.** : Ultrastructural study of the relationship between immune cytotoxic lymphoid cells and target cells in vitro. *Virchows Arch. B Cell Path.*, **17**, 229-238 (1975)

32) **Singer, S. J. & Nicolson, Garth L.** : The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Cell membranes are viewed as two-dimensional solutions of oriented globular proteins and lipids. *Science*, **175**, 720-731 (1972)

33) **Winzler, R. J.** : Carbohydrates in cell surfaces. *Int. Rev. Cytol.*, **29**, 77-125 (1970)

34) **Hughes, R. C.** : Glycoproteins as components of cellular membranes. *Prog. Biophys. Molec. Biol.*, **26**, 191-268 (1973)

## 図 説 明

Fig. 1. Light micrograph of EAC-rosette-forming cells (19 S antibody-and complement-sensitized sheep erythrocyte rosette-forming cells : EAC-RFCs) attached to target Coon cells (arrows). Target Coon cells were incubated for 6 hr with whole lymphocyte from patients with chronic active hepatitis (CAH) and then lymphoid cells forming rosette with EACs were analyzed as described under Materials and Methods. lymphocyte (L) : target cell (C) = 150 : 1.

Fig. 2. Scanning electron microscopic figure (SEM) of a monolayer target Coon cells. x 2200.

Fig. 3. Transmission electron microscopic figure (TEM) of a monolayer target Coon cell. x 8000.

Fig. 4. SEM of target Coon cells of a monolayer incubated for 24 hr with non E-RFCs (non sheep erythrocyte rosette-forming cells) from a patient with CAH. L : C = 150 : 1. In this case, % cytotoxicity of non E-RFCs against Coon cells after 48 hr incubation (L : C = 300 : 1) was 89 %, when determined by microcytotoxicity assay of Takasugi-Klein method.

4a : Many lymphocytes are attached to target Coon cells. Coverslip preparation fixed 24 hr after addition of non E-RFCs. x 2000.

4b : Target Coon cells covered with a number of lymphocytes and show pronounced shrinkage of their cytoplasm. x 3600.

Fig. 5. TEM of target Coon cells (C) of a monolayer incubated for 24 hr with non E-RFCs (L) from patients with CAH. Target cells show various cytoplasmic alterations as follows. Non E-RFCs were obtained from the same culture as Fig. 4, except 5a and 5b.

5a : An increase in number of small vesicles and vacuoles around Golgi apparatus. L : C = 100 : 1. In this case, % cytotoxicity of non E-RFCs against Coon cells was 75 %. x 7500.

5b : Mild dilatation of rough endoplasmic

reticulum (rER). L : C = 100 ; 1. In this case, % cytotoxicity of non E-RFCs against Coon cells was 79 %. x 7000.

5c : An increase in number of autophagic vacuoles (arrows). x 6000.

5d : Focal intracytoplasmic degenerative changes observed as a amorphous electron-dense material (arrow). x 7000.

5e : Focal intracytoplasmic degenerative change and segregation (arrow) and defecation (double arrow) of amorphous electron-dense material are observed. x 8500.

5f : Villus-like structure within the cytoplasm. x 9000.

5g : A large intracytoplasmic vacuole containing a number of villus-like structures. x 8000.

5h : A continuity between the rough endoplasmic reticulum (rER) and the part of the vacuole is observed, suggesting that villus-like structure is derived from rER (arrow). x 11000.

Fig. 6. TEM of a target Coon cell (C) of a monolayer to which EA-RFC (L) is attached after incubation of target Coon cells for 6 hr with whole lymphocytes from patients with CAH and with EA. (L : C = 150 : 1).

The target cell shows an increase in number of small vesicles and autophagic vacuoles, and nuclear deformity. x 4000.

Fig. 7. TEM of a target Coon cell (C) of a monolayer to which a Fc-receptor-bearing cell (C) is attached after incubation of Coon cells for 6 hr with whole lymphocytes from patients with CAH (L : C = 150 : 1). Fc-receptor-bearing cell is stained by means of peroxidase-labelled antibody method after treatment of lymphocytes with aggregated IgG.

The electron-dense reaction products are observed on the surface membrane of lymphocyte as a diffuse, fine granular pattern. x 10000.

Fig. 8. SEM of a monolayer target Coon cell incubated for 24 hr with E-RFCs from patients with CAH (L : C = 150 : 1). Only a few

lymphocytes are attached to the free surface of a target Coon cell. No significant morphological changes of the Coon cell are observed. x 2200.

Fig. 9. TEM of target Coon cells (C) from the supernatant of a monolayer culture incubated for 24 hr with non E-RFCs (L) from patients with CAH.

9a : An increase in cytoplasmic density of the target cell to which a lymphocyte is attached. (The same culture as Fig. 5b). x 6000.

9b : Lytic degeneration of the target cells in which villus-like structures are observed (arrows). (The same culture as Fig. 5c). x 7000.

Fig. 10. TEM of Coon cells from the supernatant of monolayer culture without addition of lymphocytes, showing various morphological alterations such as nuclear deformity, clumping of the chromatin in the nucleoplasm and along the inner nuclear membrane, swollen mitochondria with disrupted cristae, vacuolization of various sizes and cystic dilatation of rER. x 8000.

Fig. 11. TEM of three types of the attachment of non E-RFCs (L) to target Coon cells (C). The first is "attachment to the free surface of the target cell", as shown in Fig. 11a (The same culture as Fig. 5c). x3000. The second is "attachment to the lateral borders of the target cells", and sometimes lymphocytes penetrate in between target cells, as shown in Fig. 11b (The same culture as Fig. 5b), x 3000. The third is "a creeping in under the basal surface of the target cell", as shown in Fig. 11c (The same culture as Fig. 5c). x 3500.

Fig. 12. TEM of the attached area between a non E-RFC (L) and a target cell (C). The surface membrane of the lymphocyte appears to be undulated, and at several sites the lympho-

cyte surface membrane shows a close contact with the target cell membrane (point contact) (arrows). (The same culture as Fig. 5c). x 35000.

Fig. 13. TEM of the attached area between a non E-RFC (L) and a target cell (C). (The same culture as Fig. 5c).

13a : The close-contact area between a target cell and a lymphocyte is sometimes obscure and each cell surface membrane appear to be fused (arrows). x 49000.

13b : In the same area of 13a, after suitable tilting (25°), two intact membranes can be observed. Note fine filamentous materials in the intercellular space (arrows). x 49000.

Fig. 14. TEM of the attached area between a non E-RFC (L) and a target cell (C). (The same culture as Fig. 5c). In a few instances, a non E-RFC appears to be attached to a target cell by villous projection (arrows). x 10000. And at high magnification of the area, a non E-RFC is attached to a target cell with one or more point contacts (double arrows) (inset). x 40000.

Fig. 15. SEM of target Coon cells of a monolayer incubated for 24 hr with non E-RFCs from normal controls (L : C = 100 : 1). Many lymphocytes, but fewer than those from patients with CAH, are attached to target cells. At the right markedly deformed target cells are observed (In this case, % cytotoxicity of non E-RFCs against Coon cells was 27 %). x 700.

Fig. 16. TEM of target Coon cells (C) of a monolayer incubated for 24 hr with non E-RFCs (L) from normal controls, showing various intracytoplasmic changes such as dilatation of rER and villus-like structures (L : C = 100 : 1) (In this case, % cytotoxicity of non E-RFCs against Coon cells is 34 %). x 8000.

**Ultrastructural Observations of In Vitro Interactions between cultured Rat Liver Cells and Peripheral Blood Lymphocytes from Patients with Chronic Active Hepatitis** Tetsuji Karino, The Department of Pathology (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 – J. Juzen Med. Soc., **90**, 418–437 (1981)

**Key words:** cultured liver cell, ultrastructures of cytotoxicity, point contact, NK

#### **Abstract**

Lymphocyte subsets cytotoxic against cultured rat hepatocytes originally established by Dr. Coon, H.G. (Coon cells) were determined by microcytotoxicity assay method and analysis of lymphocyte subsets attached to Coon cells in culture. Microcytotoxicity assay revealed that non E-rosette forming cells (non E-RFC), EA-RFC and EAC-RFC of peripheral blood lymphocytes (PBL) from patients with CAH showed significantly higher cytotoxicity against Coon cells than those of healthy controls. Analysis of lymphocyte subsets attached to Coon cells supported the results of cytotoxic lymphocyte subsets obtained from microcytotoxicity assays and indicated that lymphocyte subsets cytotoxic to Coon cells were composed of multiple, heterogeneous subpopulations.

In this study morphological changes of target Coon cells and interactions between effector lymphocytes and target cells were also examined under electron microscopy. Many non E-RFCs from patients with CAH were attached to target cells mainly with many point contacts less than 1500Å in length, and Coon cells in close contact with non E-RFC displayed various cytoplasmic alterations including large vacuoles containing many intracytoplasmic villus-like structures. Coon cells floated in the culture medium also showed the same cytoplasmic changes. In the healthy controls, a small number of Coon cells with close contact with non E-RFC showed the same cytoplasmic changes as in patients with CAH, although the number of both non E-RFC attached to Coon cells and Coon cells displaying cytopathological changes encountered was fewer than that of CAH.

These results presented herein suggested that 1) cytotoxic lymphocyte subsets against Coon cells in patients with CAH might be composed of heterogeneous subpopulations, that is, non E-RFC, EA-RFC and EAC-RFC, 2) a monolayer Coon cells, after attachment with cytotoxic lymphocytes through many point contacts, showed various cytoplasmic changes indicating cellular degeneration and then became detached from a culture dish, resulting in cytolysis, 3) whether effector lymphocytes were from patients with CAH or from healthy controls, target Coon cells might be killed by the same mechanisms.

















