

ULTRASTRUCTURAL STUDIES OF SPLEEN AFTER WHOLE-BODY  
IRRADIATION

全身放射線照射後の脾臓の超微細構造の研究

SCOTT W. JORDAN, M.D.



## TECHNICAL REPORT SERIES

### 業 績 報 告 書 集

The ABCC Technical Reports provide the official bilingual statements required to meet the needs of Japanese and American staff members, consultants, advisory councils, and affiliated government and private organizations. The Technical Report Series is in no way intended to supplant regular journal publication.

ABCC業績報告書は、ABCCの日本人および米人専門職員、顧問、評議会、政府ならびに民間の関係諸団体の要求に応じるための日英両語による記録である。業績報告書集は決して通例の誌上発表に代るものではない。

# ULTRASTRUCTURAL STUDIES OF SPLEEN AFTER WHOLE-BODY IRRADIATION

全身放射線照射後の脾臓の超微細構造の研究

SCOTT W. JORDAN, M.D.

Approved 承認 20 May 1965



ATOMIC BOMB CASUALTY COMMISSION  
HIROSHIMA AND NAGASAKI, JAPAN

A Cooperative Research Agency of  
U.S.A. NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES - NATIONAL RESEARCH COUNCIL  
and  
JAPANESE NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH OF THE MINISTRY OF HEALTH AND WELFARE  
with funds provided by  
U.S.A. ATOMIC ENERGY COMMISSION  
JAPANESE NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH  
U.S.A. PUBLIC HEALTH SERVICE

原 爆 傷 害 調 査 委 員 会

広島および長崎

米 国 学 士 院 - 学 術 会 議 と 厚 生 省 国 立 予 防 衛 生 研 究 所  
と の 日 米 共 同 調 査 研 究 機 関

(米 国 原 子 力 委 員 会, 厚 生 省 国 立 予 防 衛 生 研 究 所 お よ び 米 国 公 衆 衛 生 局 の 研 究 費 に よ る)

Department of Pathology  
病理部

Surgeon, US Public Health Service, Division of Radiological Health, Research Branch, assigned to ABCC  
米 国 公 衆 衛 生 局 放 射 線 保 健 部 研 究 部 門 所 属 医 師 で ABCC へ 派 遣

## ACKNOWLEDGMENT

### 感謝のことば

The author expresses his gratitude to Drs. Shoji Tokuoka and Osamu Yamamoto of the Research Institute for Nuclear Medicine and Biology, Hiroshima University, for carrying out X-irradiation of the experimental animals.

実験動物のX線照射実施に際して、広島大学原爆放射能医学研究所の徳岡昭治および山本修両博士のご協力をいただいた。ここに感謝の意を表する。

*A paper based on this report has been accepted for publication in the following journal*

本報告に基づく論文は下記の雑誌に受理された

Experimental and Molecular Pathology

## CONTENTS

### 目 次

Introduction	緒 言 .....	1
Material and Methods	資料および方法 .....	1
Results	検査結果 .....	1
Discussion	考 察 .....	5
Summary	総 括 .....	7
References	参考文献 .....	16

#### FIGURES

図

1	Normal spleen	正常な脾臓	×14,500		8
2	Normal spleen	正常な脾臓	×26,600		8
3	38 minutes after irradiation	放射線照射後38分	×16,000		9
4	48 minutes after irradiation	放射線照射後48分	×18,500		9
5	50 minutes after irradiation	放射線照射後50分	×14,600		10
6	38 minutes after irradiation	放射線照射後38分	×24,100		10
7	38 minutes after irradiation	放射線照射後38分	×17,400		11
8	3 hours after irradiation	放射線照射後3時間	×19,000		11
9	3 hours after irradiation	放射線照射後3時間	×25,800		12
10	3 hours after irradiation	放射線照射後3時間	×25,300		12
11	3 hours after irradiation	放射線照射後3時間	×17,500		13
12	8 hours after irradiation	放射線照射後8時間	×16,100		13
13	8 hours after irradiation	放射線照射後8時間	×14,500		14
14	8 hours after irradiation	放射線照射後8時間	×15,700		14
15	24 hours after irradiation	放射線照射後24時間	×23,700		15
16	6 days after irradiation	放射線照射後6日	×11,400		15

# ULTRASTRUCTURAL STUDIES OF SPLEEN AFTER WHOLE-BODY IRRADIATION

## 全身放射線照射後の脾臓の超微細構造の研究

### INTRODUCTION

The ultrastructural changes induced in tissues and cells by ionizing radiation have been described in only a few tissues.<sup>1-7</sup> Few studies which deal with the electron microscopy of radiation effects on spleen or other lymphoid tissues are available.<sup>8,9</sup> The limited amount of information about the ultrastructural appearance of tissue following irradiation contrasts with the rather complete descriptions available on a light-microscopical level for many tissues.<sup>10</sup>

The present study was designed to allow a survey of the acute effects of whole-body X-irradiation upon lymphoid tissue of the mouse spleen and to a somewhat lesser extent upon other splenic cellular elements. Longer term, regenerative changes in lymphoid tissue have not been studied.

### MATERIAL AND METHODS

Young adult female mice of a partially inbred strain (BB), obtained commercially, were fed *ad libitum* with all purpose laboratory chow CE-2 (Nippon Haigo Hiryo KK). They were subjected to whole-body X-irradiation of 800 r and following this, experimental animals were sacrificed at intervals of 45 minutes, 3 hours, 8 hours, 24 hours, 72 hours and 6 days after irradiation and splenic tissue processed for both light and electron microscopy. Tissue for electron microscopy was fixed in buffered osmium tetroxide, at pH 7.45, and embedded in epon 812 after the method of Luft.<sup>11</sup> Sections were cut at 100 m $\mu$  with a Porter-Blum ultramicrotome and glass knives, stained with lead using Karnovsky's technique<sup>12</sup> and examined with a JEM 5G electron microscope.

### RESULTS

Lymphoid follicles comprised about one-half the volume of normal mouse spleen and red pulp, the sinusoidal component, made up most of the remainder. The same types of cells were present throughout the spleen, the difference between white pulp and red pulp being in large part due to differences between the proportions of the various types of cells present.

### 緒言

組織および細胞内に電離放射線によって誘発された超微細構造の変化については、少数の組織に関する報告があるのみである。<sup>1-7</sup> 脾臓その他のリンパ様組織に対する放射線の影響を電子顕微鏡的に観察した研究はほとんどない。<sup>8,9</sup> 光学顕微鏡による検査所見に関しては、多くの組織について概して完全な記録が入手できるのに反して、放射線照射後の組織の超微細構造については、資料が限られている。<sup>10</sup>

今回の研究では、マウスの脾臓のリンパ様組織およびやや簡単ではあるがその他の脾臓組成細胞について、全身X線照射の急性的影響の調査ができるように企画した。リンパ様組織における長期の再生性変化についての研究は、現在までのところ実施していない。

### 資料および方法

市販の部分的同系交配種 (BB) の若い雌の成体成熟マウスを入手し、多目的実験室用飼料 CE-2 (日本配合肥料株式会社製) 任意量で飼育した。これに 800 r の X線全身照射を行ない、照射後 45 分、3 時間、8 時間、24 時間、72 時間および 6 日間の間隔で、実験動物を屠殺し、光学顕微鏡および電子顕微鏡に供するためその脾臓組織を処理した。電子顕微鏡検査用の組織は、pH 7.45 の四酸化オスmium緩衝液で固定し、Luft法<sup>11</sup>によって、epon 812 の封埋標本をつくった。切片は、Porter-Blumウルトラマイクロームおよびガラス製刀で 100 m $\mu$  に切截し、Karnovsky技法<sup>12</sup>を用いて鉛染色し、JEM 5 G 電子顕微鏡で検査した。

### 検査結果

リンパ濾胞は、正常なマウスの脾臓容積の約 2 分の 1 を構成し、残余の大部分は、赤色髄、すなわち、ジスノイド組成が占める。同型の細胞が脾臓全体にわたって存在しており、白色髄と赤色髄との差異は、主としてそれら各種細胞の存在比率の差異に基づくものであった。



Lymphoid follicles contained, in addition to numerous mature lymphocytes, many immature lymphocytes, lymphoblasts or hemocytoblasts, reticulum cells, many of which were phagocytic and designated as macrophages, plasma cells and a few megakaryocytes (Figure 1).

The sinusoids of red pulp contained all normal components of peripheral blood. Sinusoidal fixed cells included reticuloendothelial cells lining sinusoids and cords, which were indistinguishable from macrophages of the lymphoid follicles (Figure 2), and larger numbers of megakaryocytes than were found in the follicles. The supporting framework of mouse spleen appeared to be a continuous network of reticulum, consisting of relatively homogeneous moderately electron dense material having in it variable numbers of small fibers, some of which showed the 670 Å banding pattern of collagen. The reticulum was identical with the sinusoidal basement membrane and was similar in appearance to basement membranes seen under epithelia, except for the presence of collagen fibers.

Sinusoidal reticulum or basement membrane was covered on both sides by reticuloendothelial macrophages, and distinction between sinusoid and cord was difficult ultrastructurally. The structure of mouse spleen appeared to be similar to that of human, rabbit, and rat spleen as described by Weiss,<sup>13,14</sup> except there was less distinction between sinusoid and cord.

Splenic trabeculae consisted of fibroblasts, and a stroma of collagen fibers and reticulum with apparent continuity between the reticulum of sinusoids and that of trabeculae. Trabecular connective tissue was intimately related to fibroblasts. Fibroblasts tended to be confined to the trabeculae, and were seen only infrequently in other parts of the spleen, which suggests that sinusoidal basement membrane is elaborated by the sinusoidal reticuloendothelial macrophages. The distribution of fibroblasts in mouse spleen apparently differs from that of the rabbit, which has fibroblasts scattered diffusely throughout its parenchyma.<sup>15</sup>

**Spleen Following Irradiation** Spleen, 45 minutes after irradiation, showed both by light and electron microscopy a moderate increase in the number of fragments of nuclear debris inside follicular macrophages, an indication of increased phagocytic activity (Figures 3,4).

Ultrastructurally, most phagocytes showed few changes except for the numerous intracytoplasmic pycnotic nuclei and cells. The cytoplasm of macrophages contained numerous pycnotic lymphocytes, with both cytoplasm and nucleus intact but markedly shrunken and electron dense (Figure 4). These were only one-third to one-half the

リンパ濾胞には、多数の成熟リンパ球のほかに、多くの幼若リンパ球、リンパ芽球または血球芽細胞、多くが食細胞性であって大食球と呼ばれる細網細胞、形質球、および少数の巨核球が含まれていた(図1)。

赤色髄のジヌソイドには、末梢血液の正常な構成分子いっさいが含まれていた。ジヌソイド固定細胞には、ジヌソイドおよび脾索の内面を蔽う細胞内皮細胞があって、これはリンパ濾胞内の大食球と区別できなかつた(図2)。また濾胞内におけるよりも多数の巨核球が認められた。マウスの脾臓支持構造物は、細網の網状組織の連続のようであって、比較的均質な中等度の電子密度をもつ物質よりなり、その中にいろいろ異なった数の小線維をもっており、その若干においては、膠原の線条間隔は670 Å型を示した。細網は、ジヌソイド基底膜そのものであって、膠原線維が認められる点を除き、その外観は上皮下にみられる基底膜と同じであった。

ジヌソイド細網すなわち基底膜は、両面が細網内皮組織大食球によって被覆されていて、ジヌソイドと脾索との区別は、超微細構造的には困難であった。マウスの脾臓の構造は、Weissが述べているように、<sup>13,14</sup> ジヌソイドと脾索との区別があまり明確でない点を除けば、人間、兎およびラットの脾臓の構造に類似しているようであった。

脾柱は、線維芽球、膠原線維の間質、および細網からなり、ジヌソイドの細網と脾柱の細網は続いているようにみえた。脾柱結合組織と線維芽球の間には密接な関係が認められた。線維芽球の存在は、いずれかといえば、脾柱に限られていて、脾臓の他の部分ではまれにしかみられなかつたが、これはジヌソイド基底膜がジヌソイドの細網内皮組織大食球からできていることと示唆する。マウス脾臓における線維芽球の分布は、実質全体に瀰漫性に線維芽球が散在する兎の場合とは異なっているようである。<sup>15</sup>

放射線照射後の脾臓所見 放射線照射の45分後、光学顕微鏡および電子顕微鏡下に、脾臓のリンパ濾胞大食球内における核崩壊物碎片数の中等度増加を認めたが、これは、食細胞活動の増強を示すものである(図3, 4)。

超微細構造的には、細胞質内に濃縮性核および細胞が多数認められた点を除いては、たいていの食細胞にほとんど変化を認めなかつた。大食球の細胞質には、多数の濃縮性リンパ球が含まれていて、その細胞質および核はともに損傷がなかつたが、著しく退縮し電子密度が高かつた(図4)。これらリンパ球の直径は、正常リンパ球の

diameter of intact lymphocytes. Occasional macrophages showed mitochondrial swelling (Figure 5), but most were unaltered except for the evidences of increased phagocytic activity. Plasma cells, fibroblasts and megakaryocytes appeared essentially unremarkable 45 minutes after irradiation.

Because Murray reported possible nuclear chromatin clumping in immature lymphocytes following irradiation,<sup>16</sup> an attempt was made to demonstrate this change by light microscopy. No consistent nuclear chromatin clumping was found in immature lymphocytic cells. Occasional immature lymphocytes showed apparent nuclear swelling and lysis by light microscopy, but they were present in small numbers, and it was not certain that they were more frequent than in non-irradiated spleen.

When examined by electron microscopy, the majority of the mature lymphocytes showed no evidence of nuclear chromatin clumping. Many immature lymphocytes or hemocytoblasts did have irregularly clumped nuclear chromatin (Figure 6), an abnormality which probably was a direct effect of the radiation. This may or may not be related to the subsequent pycnosis and phagocytosis, since mature lymphocytes rarely had clumped chromatin, yet became necrotic and were phagocytized in large numbers. Also, some lymphoblasts showed focal disruption of the nuclear membrane (Figure 7).

The phagocytized content of macrophages was maximal 3 hours after irradiation. Extensive sequestration both of pycnotic whole cells and nuclei was noticeable both by light and electron microscopy (Figures 8,9). Some macrophages contained clumps of cytoplasmic material including mitochondria and ribosomes in addition to pycnotic nuclei. At this time a few pycnotic, electron dense lymphocytes were found extracellularly (Figure 10).

Cytoplasmic elements without nuclear debris were not found in the cytoplasm of macrophages, but numerous nuclear remnants devoid of cytoplasmic material were seen. This finding indicates that the cytoplasmic material of phagocytized cells was digested more rapidly than the nuclei or perhaps that some lymphocytes may undergo cytoplasmic lysis before phagocytosis. Schwartzendruber and Congdon<sup>17</sup> reported the presence of ingested whole, shrunken cells with intact cytoplasm in the reticulum cells of mouse spleen following antigenic stimulation. Most of the pycnotic cells in their material were plasma cells, which were considered to be related to an immunologic response induced by the antigenic stimulation.

その約1/2にすぎなかった。ごく少数の大食球に糸粒体の膨脹を認めたが(図5)、たいていは食細胞活動の増強以外に変化は認められなかった。放射線照射45分後の形質球、線維芽球および巨核球には本質的には著変はないようであった。

Murrayが放射線照射後における幼若リンパ球に核染色質凝集が起こる可能性を報告しているので、<sup>16</sup> 光学顕微鏡によってこの変化の立証を試みたが、幼若リンパ球には一貫した核染色質凝集の事実は認められなかった。光学顕微鏡による検査では、時に幼若リンパ球に核膨脹および崩壊と思われるものを認めたが、その数は少なく、それらが放射線照射を受けない脾臓の場合より顕発していたかどうかは明確でなかった。

電子顕微鏡による検査では、成熟リンパの大多数に核染色質凝集の形跡は認められなかった。多くの幼若リンパ球ないし血球芽細胞に、不規則に凝集した核染色質が確かにあり(図6)、これは放射線の直接影響かと思われる異常である。その後の核濃縮および食作用にこのことは関係があるかもしれない、またないかもしれない、というのは、成熟リンパ球では染色質の凝集はまれであったが、壊死性となって食細胞によって摂取されるものが多数認められたからである。また、リンパ芽球に核膜の葉状破壊を認めたものもあった(図7)。

放射線照射3時間後、大食球の食細胞量は最高に達した。核濃縮性細胞全体および核の広範な離解を、光学顕微鏡および電子顕微鏡下に認めることができた(図8,9)。若干の大食球は、濃縮性核のほか、糸粒体およびリボソームをその内容とする細胞質塊も含んでいた。なお、この時期には、核濃縮性で電子密度の高いリンパ球を細胞外に少数認めた(図10)。

核崩壊物を含まない細胞質性物質は大食球の細胞質には見出されなかったが、細胞質性物質を伴わない核崩壊物は多数認められた。この所見は、食細胞によって摂取された細胞の細胞質性物質は核よりも急速に消化されること、あるいはまた、若干のリンパ球においては、食作用が行なわれる前に細胞質の容解が起こることもあるということを示すものである。Schwartzendruber および Congdon<sup>17</sup> は、抗原性刺激を加えたあと、マウス脾臓の細網細胞内に無傷の細胞質をもった退縮した細胞全体が摂取されているのを認めたことを報告した。かれらの材料における核濃縮性細胞の大部分は形質球であって、これは抗原性刺激によって誘発された免疫学的反応と関係があるものと考えられた。



By 8 hours after irradiation the peak of phagocytic activity had passed although there remained a marked increase over normal in the amount of phagocytized debris. Laminated membranes resembling myelin figures were seen in relation to some of the nuclear debris (Figure 12). These laminated membranes tended to occur after partial digestion of the nuclei and were present in control tissue, although they were found much more frequently following irradiation.

Plasma cells showed moderate dilatation of the endoplasmic reticular cisterns (Figure 13) somewhat more frequently than in control tissue, but there were no significant changes in most of them. Occasional plasma cells showed disorganization of the parallel arrays of rough endoplasmic reticulum, with the formation of numerous cytoplasmic vessels rimmed by ribosomes (Figure 14). No changes were found in fibroblasts or trabeculae.

Evidence of moderate lymphocyte necrosis and phagocytosis was still present 24 hours after irradiation. Many of the numerous small nuclear fragments in macrophages were probably remnants of lymphocytes phagocytized in the first few hours after irradiation, but there was also recently phagocytized debris and whole pycnotic lymphocytes were occasionally observed.

Many plasma cells were essentially normal, while others showed mild sinusoidal dilatation, similar to the findings at 8 hours after irradiation. No changes were observed in fibroblasts (Figure 15), which appeared entirely normal.

Three days following irradiation the spleen grossly was markedly reduced in size. The reduction in size was due to dropping out of cellular elements. The cell loss was even more marked than was grossly apparent because of the moderately severe congestive changes which were present in the sinusoids of red pulp. Reticuloendothelial cells lining the sinusoids, and those in the small residual lymphoid follicles ultrastructurally showed no apparent abnormalities except for the presence of increased phagocytic debris most of it apparently old. Very little evidence of recent phagocytosis was found. Megakaryocytes were reduced in number by light microscopy, but their ultrastructural appearance was essentially normal except for possible reduction in the number and density of platelet alpha granules. Plasma cells were unchanged from their appearance at 24 hours after irradiation, and fibroblasts appeared essentially normal.

Six days after irradiation, the spleen was extremely shrunken and continued to show moderate congestion, thus the total number of parenchymal cells was much smaller

放射線照射後 8 時間では、食作用による崩壊物の量に、依然として正常量以上の著増が認められたが、食細胞活動のピークは過ぎていた。ミエリン様の薄片か、核崩壊物若干に関連して観察された (図 12)。これらの薄片は、細胞核の部分的消化が行なわれたあとに現われやすく、放射線照射後の方がはるかに多くはあったが、対照組織にもこれが認められた。

形質球では内原形質細網槽に軽度の拡張があって (図 13)、これは対照組織の場合よりも多少多発したが、そのほとんどに著変は認めなかった。ごく少数の形質球に、その粗雑な内原形質細網の平行配列の崩壊、および、リボソームによって縁付けられた多数の細胞質性脈管の形成を認めた (図 14)。線維芽球ないし脾柱には変化を認めなかった。

放射線照射 24 時間後、依然として中等度のリンパ球壊死および食作用の行なわれているのを認めた。大食球内の多数の核破砕片の多くは、おそらく放射線照射後最初の 2・3 時間で食細胞に摂取されたりリンパ球の残遺物であると思われたが、食作用を受けて間もない崩壊物もあり、形が完全な核濃縮性リンパ球も散見された。

多くの形質球は本質的に正常であったが、その他の細胞では軽度のジクソンイド拡張を認め、これは放射線照射 8 時間後の所見に等しかった。線維芽球には変化を観察せず (図 15)、全く正常にみえた。

放射線照射 3 日後、脾臓は肉眼的に著しく縮小した。この縮小は細胞的要素の消失に起因した。細胞消失は、赤色髄のジクソンイドに中等度に重篤な鬱血性変化があったために、肉眼的に認められた以上に著明であった。ジクソンイドの内面を蔽う細網内皮細胞および残留小リンパ濾胞内の細網内皮細胞には、超微細構造上、食作用による崩壊物の増加を除き異常を認めなかった。その崩壊物も大部分は古いもののようにみえた。最近の食作用の形跡はほとんど認められなかった。光学顕微鏡下に巨核球数の減少を認めたが、血小板アルファ顆粒の数および濃度に減少があるかもしれない点を除き、巨核球の超微細構造的外観は本質的に正常であった。形質球は放射線照射後 24 時間経過時の外観と変わらず、線維芽球は本質的に正常にみえた。

放射線照射 6 日後、脾臓は極度に退縮し引き続き中等度の鬱血を示し、かくて、実質細胞の総数は、その大きさ

than might be expected from its size. Sinus reticulo-endothelial cells contained moderately large amounts of partly digested phagocytized material (Figure 16), but evidence of recent phagocytosis was not seen. No differences could be detected between these sinus lining macrophages and those of control spleen except for the more abundant phagocytic debris. There was relative increase in the number of immature lymphocytes, which had multiple large nucleoli and a moderate amount of cytoplasm with many mitochondria.

Increased numbers of hemocytoblasts were seen. These immature blastlike cells probably are lymphocyte and plasma cell precursors and typically have cytoplasmic ribosomes arranged in clusters, in addition to large nuclei and moderately abundant cytoplasm.<sup>18</sup> There were also numbers of moderately large cells with much rough endoplasmic reticulum, similar to plasma cells in general appearance. These probably were plasmablasts. The presence of these two types of primitive cells, hemocytoblasts and plasmablasts, indicates the beginning of regenerative changes which if continued, presumably would allow gradual reconstitution of splenic parenchyma in the small proportion of surviving animals. Six days after irradiation was the longest time period studied.

## DISCUSSION

Previous investigations of the histologic changes in spleen after irradiation were reported by Murray in 1948.<sup>16</sup> He exposed mice to 350r of whole-body X-ray, which was two-thirds of the LD<sub>50</sub> dose at 30 days, and described the light microscopical appearance of spleen at intervals from 1 hour to 21 days. The presently reported material serves to confirm Murray's light microscopical observations in most details. Murray described marked lymphocytic destruction with nuclear pycnosis and karyorrhexis, and phagocytosis by macrophages in the first few hours after irradiation, with subsequent marked reduction in the cellular content of white pulp. There was partial morphologic recovery in his material by 3 weeks after irradiation.

As previously indicated, Murray noted nuclear chromatin clumping in immature lymphoid cells. In the presently reported material, this finding was only provisionally demonstrated by light microscopy, although nuclear clumping was observed with the electron microscope. It is difficult to evaluate the significance of this chromatin clumping in immature lymphocytes since mature lymphocytes, which more frequently showed cytopathic change, did not display clumped nuclear chromatin.

から期待されるかと思われる総数に比べてはるかに少なかった。脾洞の細網内皮細胞には、一部消化された食作用産物が中等量含まれていたが(図16)、最近の食作用の形跡はなかった。脾洞の内面を蔽うこれら大食球と対照脾臓のそれとの間には、前者に食作用による崩壊物が多いということのほかは、差は認められなかった。幼若リンパ球数には相対的増加があり、大きな多重核小体、および多くの糸粒体を含む中等量の細胞質をこれに認めた。

血球芽細胞についてはその増加を認めた。これらの幼若芽球様細胞は、おそらくリンパ球および形質球の前段階であり、大細胞核および中等度に豊富な細胞質のほかに、典型的な例においては集塊状の配列を示す細胞質リボソームをもつ。<sup>18</sup> また外観的には、形質球の場合と同様に、非常に粗雑な内原形質細網をもつ中等度の大きさの細胞が多数認められた。これらは、おそらく形質芽球であったのであろう。これら二種の原始細胞、すなわち、血球芽細胞および形質芽球の存在は、再生的変化の発端を示すもので、もしこれが継続したならば、おそらくは少数の生残った動物における脾臓実質を漸次再生させることになる。6日間は、放射線照射後に実施した研究の最長期間であった。

## 考 察

1948年Murrayは、先に実施した放射線照射後の脾臓の組織学的変化に関する調査について報告した。<sup>16</sup> かれは、マウスに350 r (30日間のLD<sub>50</sub>の3分の2に相当する線量)の全身X線照射を行ない、1時間から21日までの光学顕微鏡下に見た脾臓像を記述した。ここに報告する資料は、このMurrayの光学顕微鏡による観察を大部分の点で確認するものである。Murrayは、放射線照射後最初の2・3時間内に核崩壊および核濃縮を伴う著明なリンパ球の破壊、および大食球による食作用が始まり、次いで白色髄の細胞含有量が著明に減少することを報告している。放射線照射後3週までに、かれの検査材料には、部分的な形態学的回復が認められた。

先に述べたように、Murrayは幼若リンパ様細胞内の核染色質凝集を認めた。ここに報告する材料では、核凝集は電子顕微鏡で観察されたが、核染色質凝集は光学顕微鏡下に暫定的に証明されたにすぎなかった。細胞病理学的変化を多く認めた成熟リンパ球に、核染色質凝集が認められなかったところから、幼若リンパ球におけるこの染色質凝集の意義を明確にすることは困難である。

The splenic cells most sensitive to damage by X-radiation were small mature lymphocytes, while immature cells seemed to be less sensitive. Reticular macrophages showed mitochondrial changes which may be due to radiation, and of course there was a marked increase in phagocytic activity by the macrophages. Megakaryocytes and plasma cells were relatively resistant to radiation, although they showed minor changes. No changes were recognized in fibroblasts following irradiation.

Marked differences among various types of cells in susceptibility to nuclear pycnosis and chromatin clumping following ionizing radiation has been described in brain tissue by Pitcock<sup>7</sup> who found nuclear pycnosis and chromatin clumping in cerebellar granular layer neurons, but only minimal chromatin clumping in neurons of other sites and glial cells.

Braun<sup>2</sup> reported the changes in small gut epithelium following 450 r whole-body irradiation of mice. The epithelial cells showed vacuolization of endoplasmic reticulum at 2 hours, becoming much more marked by 6 hours. There were few early changes in mitochondria, although they showed some swelling 24 hours after irradiation. By this time the endoplasmic reticulum had probably recovered. Amongst splenic cells plasma cells and reticular macrophages have the most endoplasmic reticulum; lymphocytes have scant endoplasmic reticulum. No significant changes were observed in the smooth or rough endoplasmic reticulum of macrophages and there was only slight dilatation of endoplasmic reticular cisterns in plasma cells. Mitochondrial swelling and slight central vacuolization were found occasionally in macrophages but in lymphocytes only when there were other evidences of cytoplasmic or nuclear damage.

Seki and co-workers<sup>8</sup> in an abstract reported disintegration of lymphocytes and lymphoblasts 2 hours after irradiation, followed by condensation and increased electron density of the fragments prior to phagocytosis by macrophages. In the present study lymphocytes were sometimes found to undergo marked pycnosis extracellularly, but in most instances appeared to have been phagocytized whole and to have fragmented subsequently while within macrophage cytoplasm.

Splenic lymphocytes following whole-body irradiation appear to undergo rather sudden general shrinkage of nucleus and cytoplasm, with concomitant marked increase in their electron density. In many instances whole

X線の傷害作用に対し最も敏感な脾臓の細胞は小さな成熟リンパ球であって、他方幼若細胞では感受性はそれほど強くないように思われた。細網大食球には放射線に起因すると思われる糸粒体の変化を認め、もちろん、大食球による食細胞活動には著明な増強が認められた。巨核球および形質球は軽度の変化を示したが、放射線に対しては比較的強い抵抗を示した。線維芽球には放射線照射後の変化は認めなかった。

Pitcock<sup>7</sup> は、電離放射線照射後脳組織における各種細胞間にみられる核濃縮および染色質凝集に対する著しい感受性の差について記述しているが、それによれば、小脳顆粒層の神経単位には核濃縮および染色質凝集を認めしたが、その他の部位の神経単位および神経膠細胞では、きわめて軽度の染色質凝集を認めたにすぎないという。

Braun<sup>2</sup> は、マウスに 450 r の全身 X 線照射を行なったのち、小腸上皮に現われた変化について報告した。2 時間後に、上皮細胞における内原形質細網の空胞形成を認め、これは、6 時間後にはいよいよ著明となった。糸粒体は放射線照射後 24 時間で若干膨脹したが、初期変化はほとんどこれに認められなかった。この時まで、内原形質細網はおそらく回復していたものと思われる。脾臓細胞のうち形質球および細網大食球には、最も多く内原形質細網が認められ、リンパ球にはこれが少なかった。大食球の平滑または粗雑内原形質細網には有意の変化は認められず、また、形質球においては、内原形質細網槽の軽度拡張を認めたにすぎなかった。糸粒体の膨脹およびその中心部における軽度の空胞形成が時に大食球に認められたが、リンパ球では細胞質または核にその他の損傷が認められた場合のみこれを認めた。

関ら<sup>8</sup> は、放射線照射 2 時間後、リンパ球およびリンパ芽球の崩壊を認め、続いて大食球による食作用開始に先立ち破砕片の凝集とその電子密度の濃化が起こることを抄録で報告した。このたびの研究では、リンパ球には時に著しい細胞外核濃縮の起こるのが認められたが、たいいていの場合、リンパ球全体がまず食作用によって摂取され、次いで大食球細胞質内にある間にそれが破砕されていたようであった。

放射線全身照射後の脾臓リンパ球には、核および細胞質に概して急激な総体的退縮現象が起こり、これに電子密度の著しい濃化が随伴するもののように思われる。多くの場合、核濃縮の起こった細胞全体が、大食球によって

pycnotic cells were phagocytized by macrophages and non-phagocytized necrotic cells seen in the extracellular space showed similar marked shrinkage and electron density, yet were not fragmented. Fragmentation of nuclei or cells therefore does not appear to be the usual mechanism of lymphocyte necrosis after irradiation. Phagocytized necrotic lymphocytes have an appearance similar to that of the tingible bodies reported by Schwartzendruber and Congdon<sup>17</sup> in spleen reacting physiologically to antigenic stimulation. Shrinkage or pycnosis may be the way lymphocytes react to a variety of necrotizing agents. Possibly this is related to loss of cellular water with retention of organic molecular constituents. The marked electron density of the pycnotic cells argues that there must be considerable retention of organic content. The digestion of lymphocytes by macrophages after radiation damage does not seem to differ from similar digestive activity observed in control spleen.

After the pycnotic lymphocyte has been phagocytized, its cytoplasm disappears rapidly, followed by nuclear lysis at which time myelin-like laminated membranes appear.

Most of the lymphocytes became necrotic and were phagocytized in the first 8 hours after irradiation. Thereafter necrosis of lymphocytes continued at a slower rate, suggesting that the diminution of splenic cellularity several days after irradiation results from loss of individual cells as well as retarded regenerative proliferation.

## SUMMARY

The ultrastructural changes in mouse spleen during the first 6 days after 800 r of whole-body irradiation have been described. Mature lymphocytes showed early cytonecrosis, characterized by marked cellular shrinkage without fragmentation and usually were phagocytized whole by reticular macrophages, subsequently fragmented and were digested.

Immature lymphocytes showed chromatin clumping, in addition to cytonecrotic changes like those in mature lymphocytes but appeared less sensitive to radiation than mature lymphocytes.

There was mild dilatation of endoplasmic reticular cisterns in plasma cells, but reticular macrophages, megakaryocytes and fibroblasts appeared to be directly affected relatively little by radiation.

摂取され、細胞外間隙に観察される摂取されなかった壊死細胞には同様の著明な退縮および電子密度の濃化は認められなかったが、破碎は起こっていなかった。したがって、核または細胞の破碎現象は、放射線照射に伴う通例的なリンパ球壊死機序を示すものではないようである。抗原性刺激に対して生理学的反応を示す脾臓においては、食作用によって摂取された壊死リンパ球は、Schwartzendruber および Congdon<sup>17</sup> によって報告された可染体と同じ外観を呈する。退縮または核濃縮現象は、種々の壊死性作因に対するリンパ球の反応の仕方を示すものであるかもしれない。おそらくこれは細胞水が失われて器質性分子成分が残る関係からくるものであろう。核濃縮性細胞に著しく電子密度が高いことは、器質的内容物が相当量残留しているに違いないことを強く示すものである。放射線障害を受けたあとにみられる大食球のリンパ球消化活動には、対照脾臓に観察される同じ消化活動と変わりはないように思われる。

核濃縮性リンパ球が食作用により摂取されると、その細胞質は急速に消失し、次いで核溶解が起こり、その際、ミエリン様薄片が出現する。

放射線照射後最初の 8 時間で、リンパ球の大多数は壊死性となり、食細胞に摂取された。その後、リンパ球の壊死は、さらに緩慢な速度で続くが、これは、放射線照射数日後にみられる脾臓の細胞充実性の下降が、個々の細胞の喪失ならびに再生増殖活動の遅延によるものであることを示唆する。

## 総括

800 r の全身 X 線照射後最初の 6 日間マウス脾臓の超微細構造に認められた変化について述べた。成熟リンパ球に、初期の細胞壊死を認め、破碎を伴わない著明な細胞退縮がその特徴であったが、リンパ球全体が普通細網大食球によって摂取され、ついで破碎消化された。

幼若リンパ球では、成熟リンパ球におけるような壊死性変化のほかに染色質凝集を認めたが、放射線に対して成熟リンパ球よりも感受性が少ないようであった。

形質球の内原形質細網槽には、軽度の拡張があったが、細網大食球、巨核球および線維芽球には、放射線による直接的な影響はほとんどないようであった。



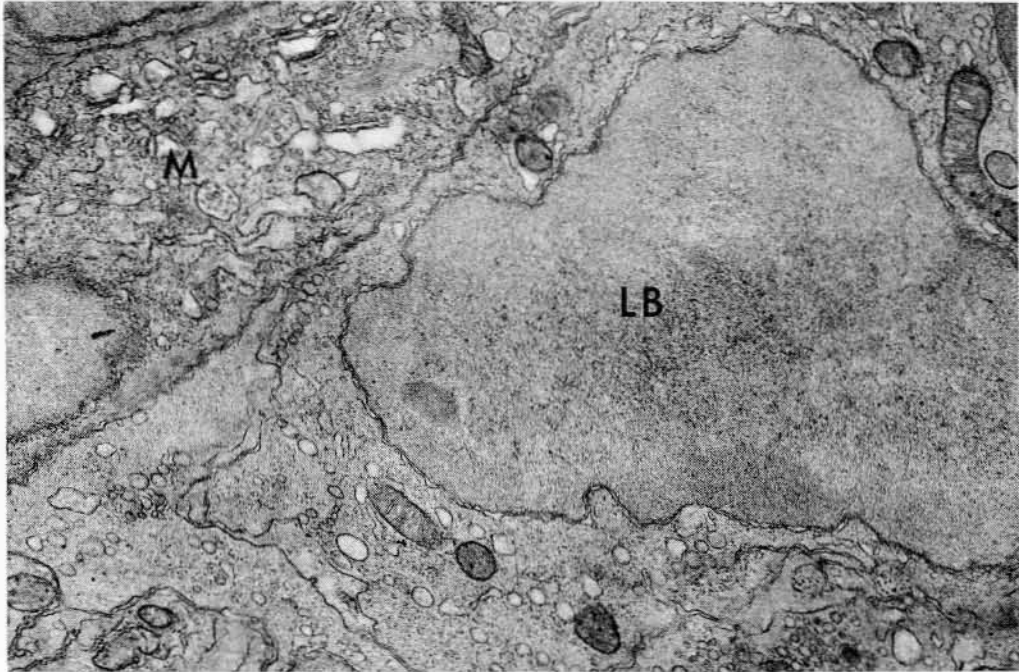


Figure 1 Normal spleen. A lymphoblast (LB) showing abundant cytoplasm with many ribosomes and several mitochondria. Part of a reticular macrophage (M) has numerous Golgi membranes and rough endoplasmic reticulum ( $\times 14,500$ ).

図1 正常な脾臓。リンパ芽球(LB)には多くのリボース体および数個の糸粒体を伴う豊富な細胞質を認める。細胞大食球(M)の一部に、多数のゴルジ膜および粗雑な内原形質細胞網がある( $\times 14,500$ )。

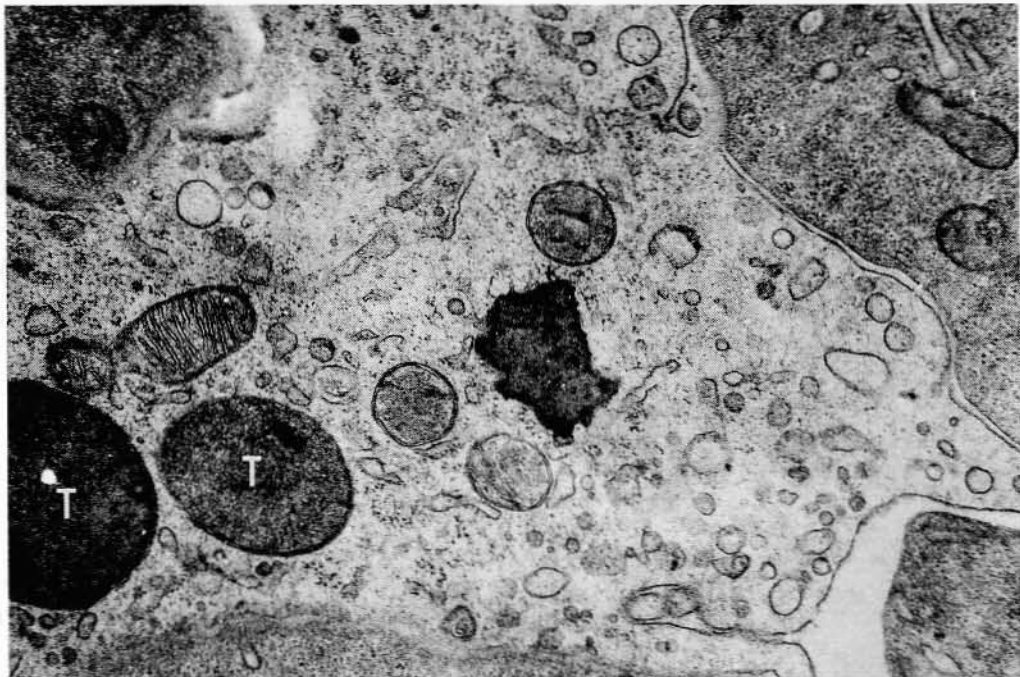


Figure 2 Normal spleen. Tingible bodies (T) remnants of phagocytized and digested cellular material in the cytoplasm of a macrophage ( $\times 26,600$ ).

図2 正常な脾臓。可染体(T)、大食球細胞質内における摂取消化された細胞性物質の残遺物( $\times 26,600$ )。

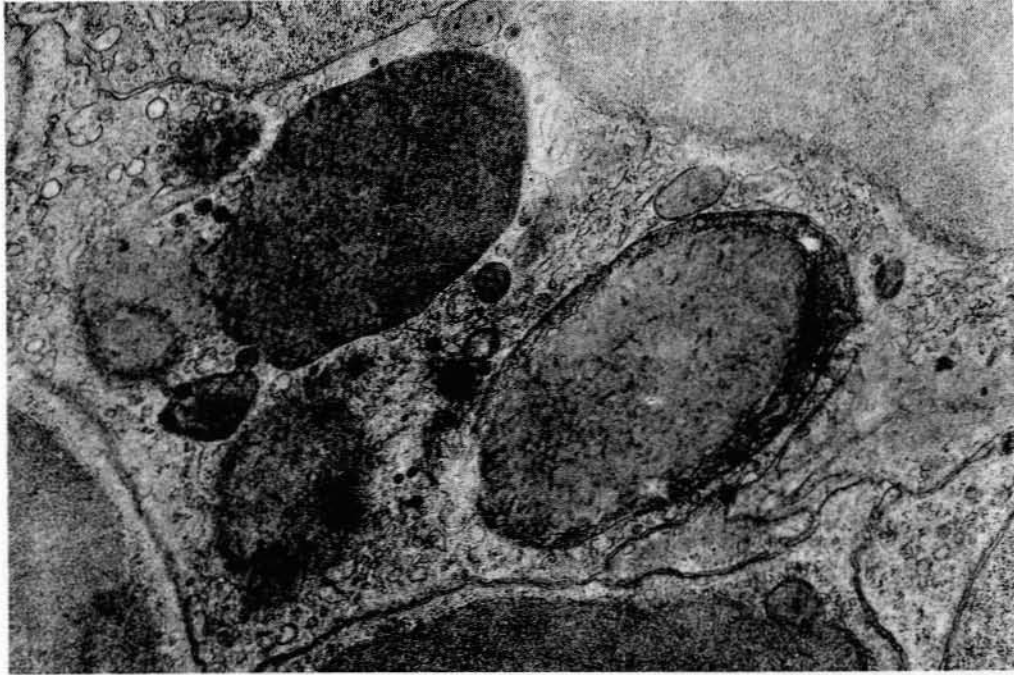


Figure 3 38 minutes after irradiation. Recently phagocytized cellular material in a macrophage, including one markedly pycnotic cell, probably a lymphocyte, the nucleus and cytoplasm of which appear to be intact ( $\times 16,000$ ).

図3 放射線照射後38分。大食球内の摂取されて間のない細胞性物質であって、1個の著明な核濃縮細胞を認める。おそらくこれはリンパ球であって、その核および細胞質は無傷に見える ( $\times 16,000$ )。

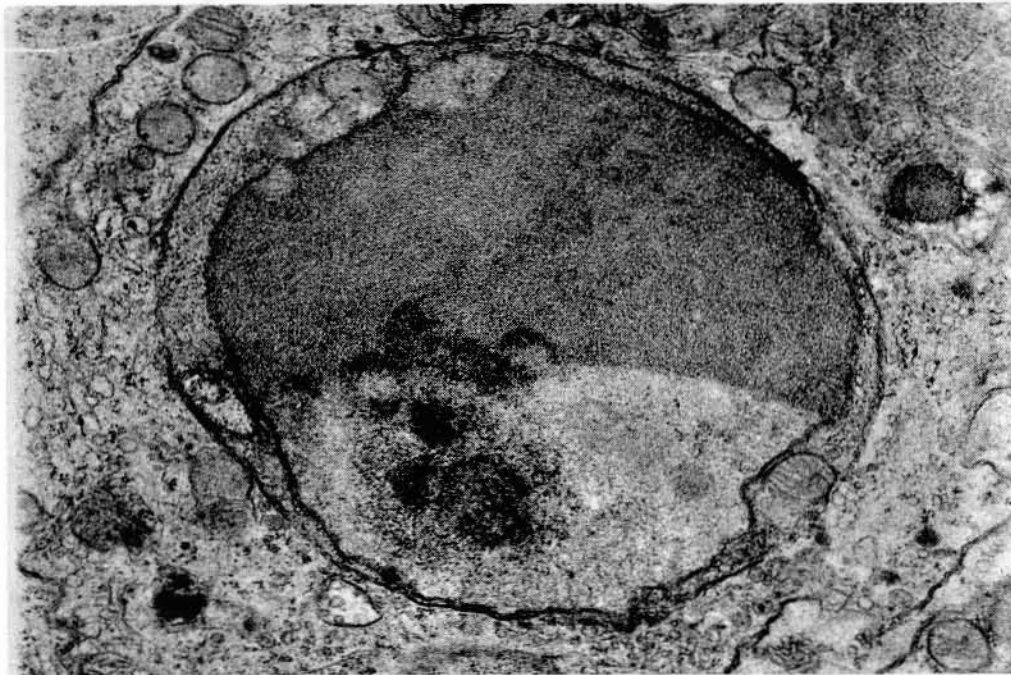


Figure 4 48 minutes after irradiation. Cytoplasm of a macrophage contains a pycnotic, electron dense lymphocyte whose nuclear and cytoplasmic membranes appear intact. A mitochondrion is recognizable in the cytoplasm of the phagocytized lymphocyte ( $\times 18,500$ ).

図4 放射線照射後48分。大食球の細胞質には、核濃縮性で電子密度の高いリンパ球が含まれ、その核膜および細胞質膜は無傷のようである。摂取されたリンパ球の細胞質内に、糸粒体を認めることができる ( $\times 18,500$ )。



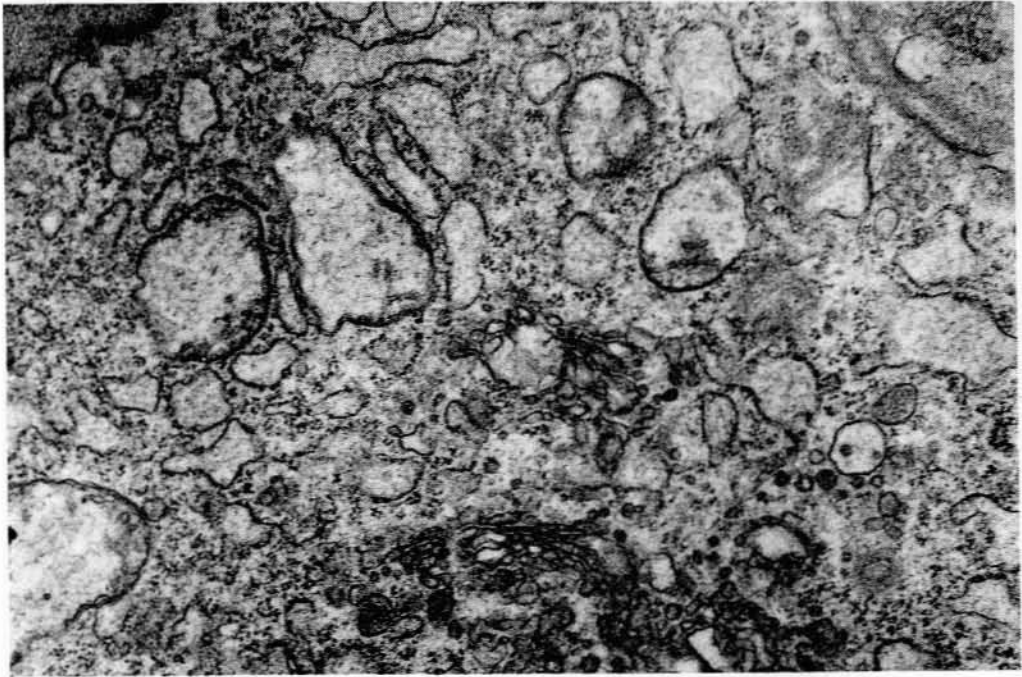


Figure 5 50 minutes after irradiation. Dilatation and vacuolization of mitochondria and mild widening of rough endoplasmic reticular cisterns in the cytoplasm of a macrophage ( $\times 14,600$ ).

図5 放射線照射後50分. 大食球細胞質における糸粒体の膨脹および空胞形成ならびに粗雑な内原形質細網槽の軽度の拡張( $\times 14,600$ ).

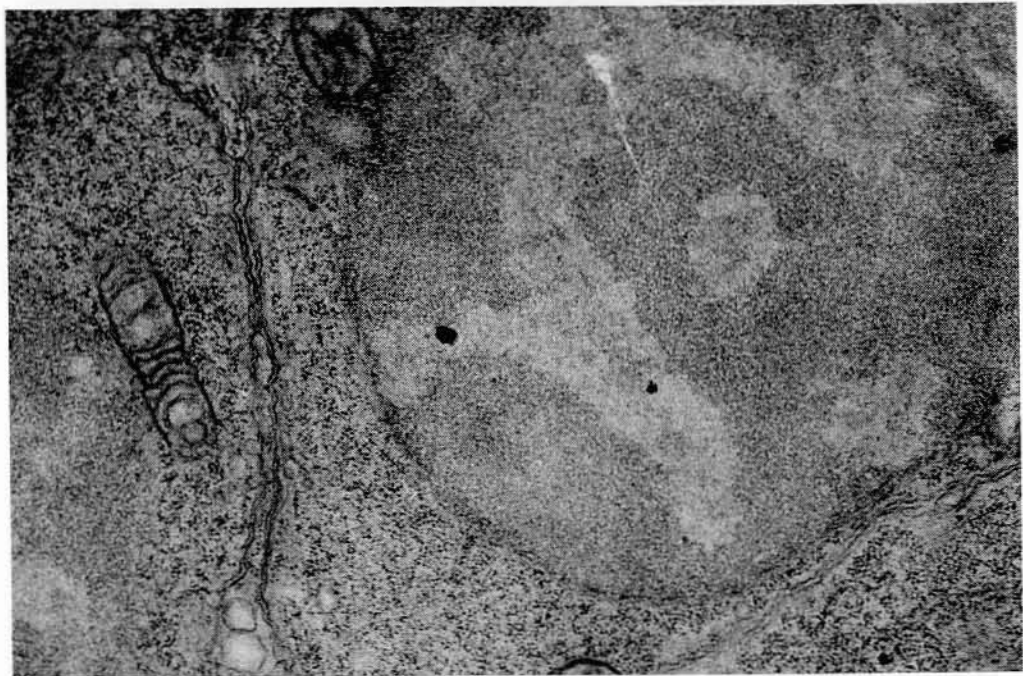


Figure 6 38 minutes after irradiation. An immature lymphoid series cell shows irregular clumping of nuclear chromatin ( $\times 24,100$ ).

図6 放射線照射後38分. 幼若リンパ様細胞系に不規則な核染色質凝集を認める( $\times 24,100$ ).

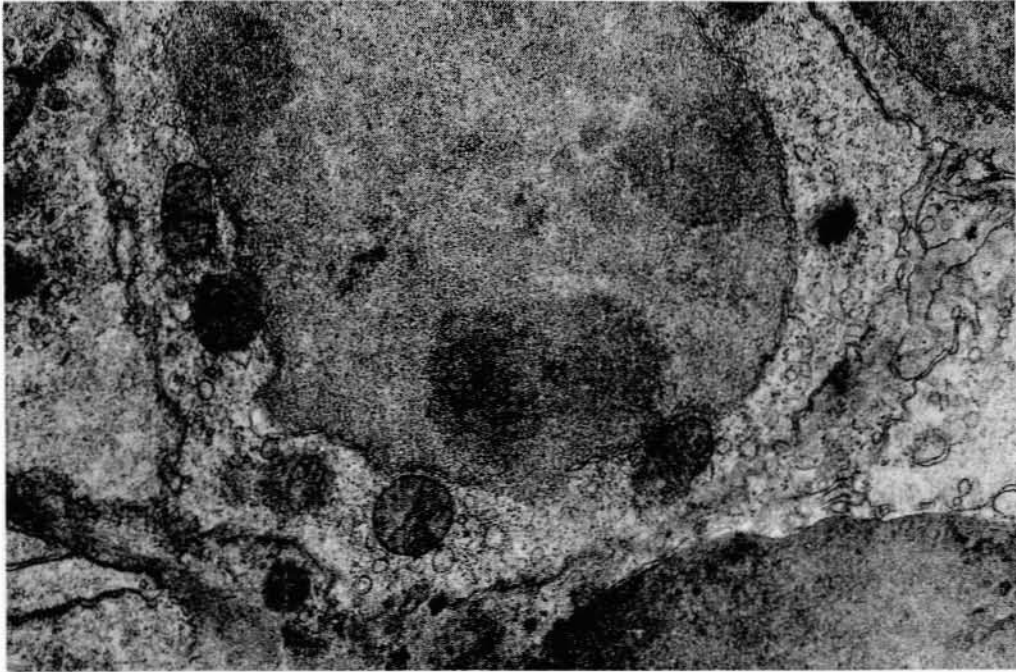


Figure 7 38 minutes after irradiation. A lymphoblast has clumped nuclear chromatin and the nuclear membrane is focally disrupted ( $\times 17,400$ ).

図7 放射線照射後38分、リンパ芽球の核染色質凝集および核膜の巣状破壊を認める ( $\times 17,400$ )。

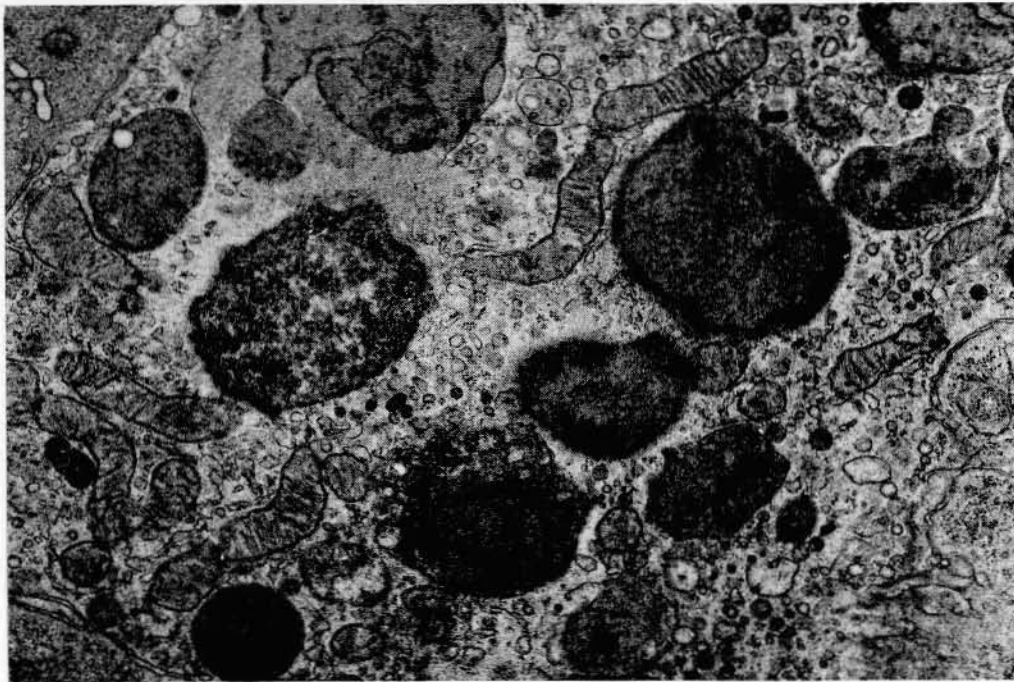


Figure 8 3 hours after irradiation. Large quantities of electron dense phagocytized debris, most of it of nuclear origin ( $\times 19,000$ ).

図8 放射線照射後3時間、多量の電子密度の高い食作用による崩壊物を認める。その大部分は細胞核崩壊物 ( $\times 19,000$ )。



Figure 9 3 hours after irradiation. A phagocytized lymphocyte is pycnotic and electron dense. Note preservation of nuclear and cytoplasmic membranes and mitochondria ( $\times 25,800$ ).

図9 放射線照射後3時間。食作用により摂取されたリンパ球は、核濃縮性で電子密度が高い。核膜および細胞質膜が保存されている点に注意すること( $\times 25,800$ )。

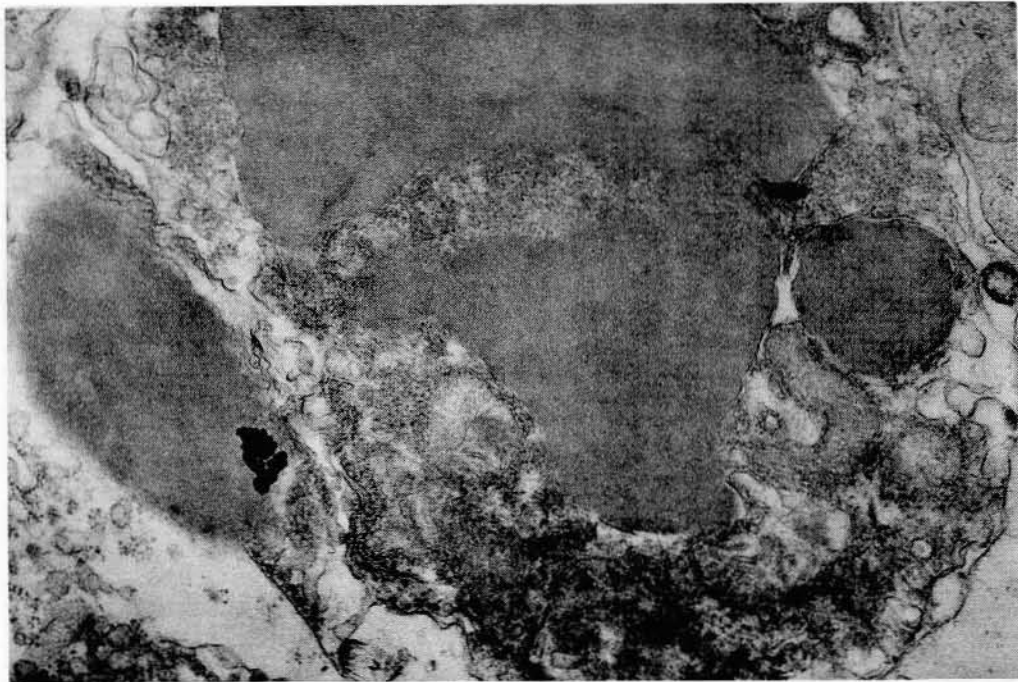


Figure 10 3 hours after irradiation. A distorted, electron dense pycnotic cell, probably a lymphoblast, lies free in a tissue space. Its diameter,  $5.3 \mu$ , is only slightly larger than that of necrotic phagocytized lymphocytes within macrophages ( $\times 25,300$ ).

図10 放射線照射後3時間。リンパ芽球と思われる歪んだ形の電子密度の高い核濃縮性細胞が組織間隙内に遊離して存在する。その直径 $5.3 \mu$ は、大食球内に摂取された壊死リンパ球の直径よりも、わずかに大である( $\times 25,300$ )。





Figure 11 3 hours after irradiation. An immature cell, probably a lymphoblast, shows no recognizable abnormalities. Many cells which appeared ultrastructurally normal were present after irradiation ( $\times 17,500$ ).

図11 放射線照射後3時間、リンパ芽球と思われる幼若細胞に異常と認められるものはない。放射線照射後に、超微細構造的に正常とみえる多くの細胞を認める( $\times 17,500$ )。



Figure 12 8 hours after irradiation. Macrophages contain phagocytized debris which shows partial replacement by laminated membranous material, the result of partial digestion. These laminated membranes indicate the presence of phospholipid ( $\times 16,100$ ).

図12 放射線照射後8時間。大食球には、薄膜性物質により一部置換された、すなわち、部分的消化を示す食作用による崩壊物を認める。これらの薄膜片は、磷脂質の存在を示す( $\times 16,100$ )。

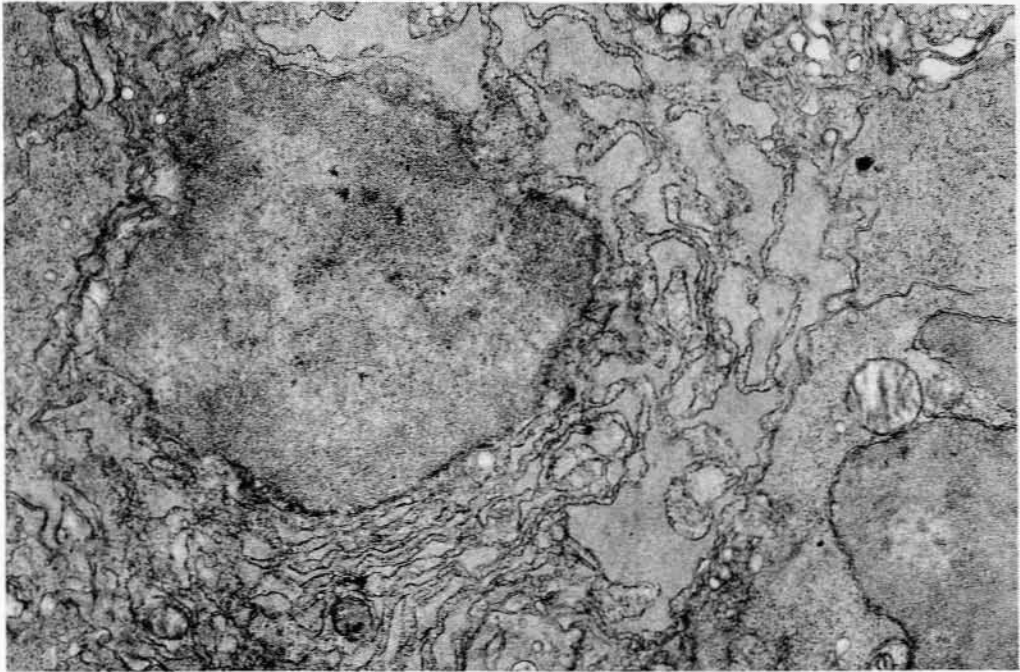


Figure 13 8 hours after irradiation. A plasma cell shows no recognizable change from normal, except for moderate dilatation of rough endoplasmic reticular cisterns ( $\times 14,500$ ).

図13 放射線照射後8時間。粗雑な内原形質細網槽に中等度の拡張があるほかは、形質球に正常と異なるところは認められない( $\times 14,500$ )。

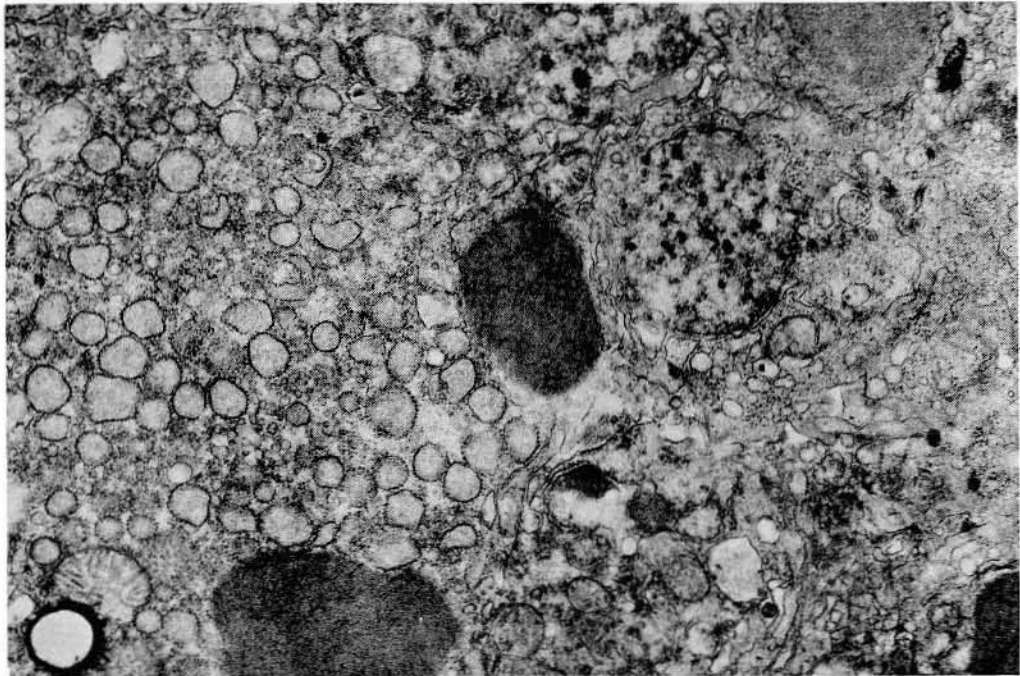


Figure 14 8 hours after irradiation. A plasma cell shows disorganization of the rough endoplasmic reticulum and the formation of numerous vesicles with ribosomes on the exterior surface ( $\times 15,700$ ).

図14 放射線照射後8時間。粗雑な内原形質細網の崩壊および外表にリボゾ体を有する多数の小胞形成を形質球に認める( $\times 15,700$ )。

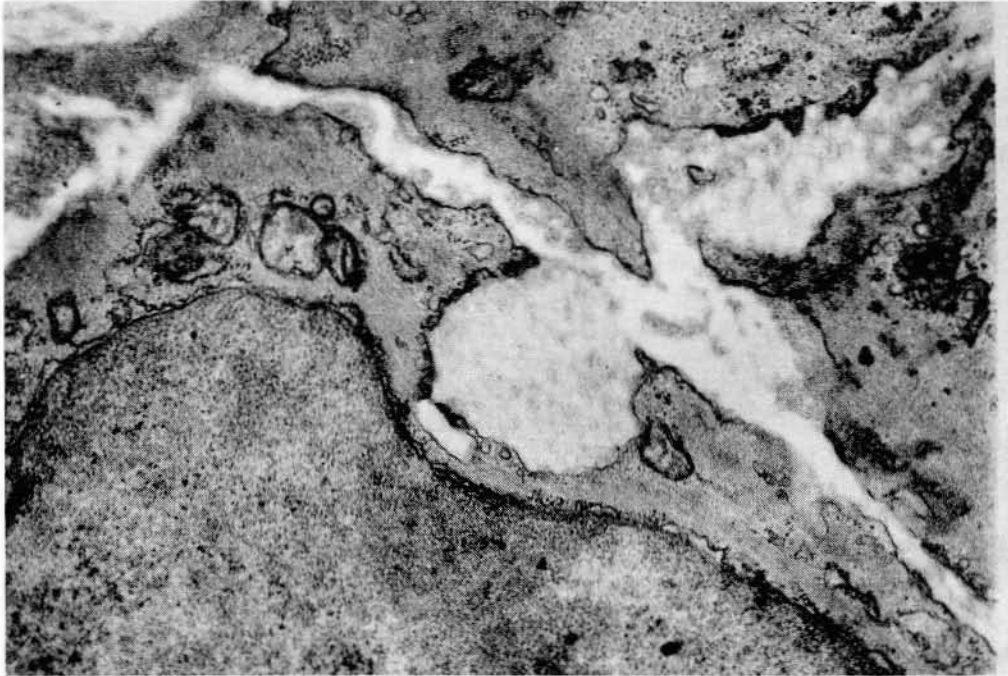


Figure 15 24 hours after irradiation. Parts of several fibroblasts and collagen bundles show no abnormalities attributable to irradiation ( $\times 23,700$ ).

図15 放射線照射後24時間。少数の繊維芽球および膠原質網索の各部に、放射線照射に起因するとみられる異常を認めない ( $\times 23,700$ )。

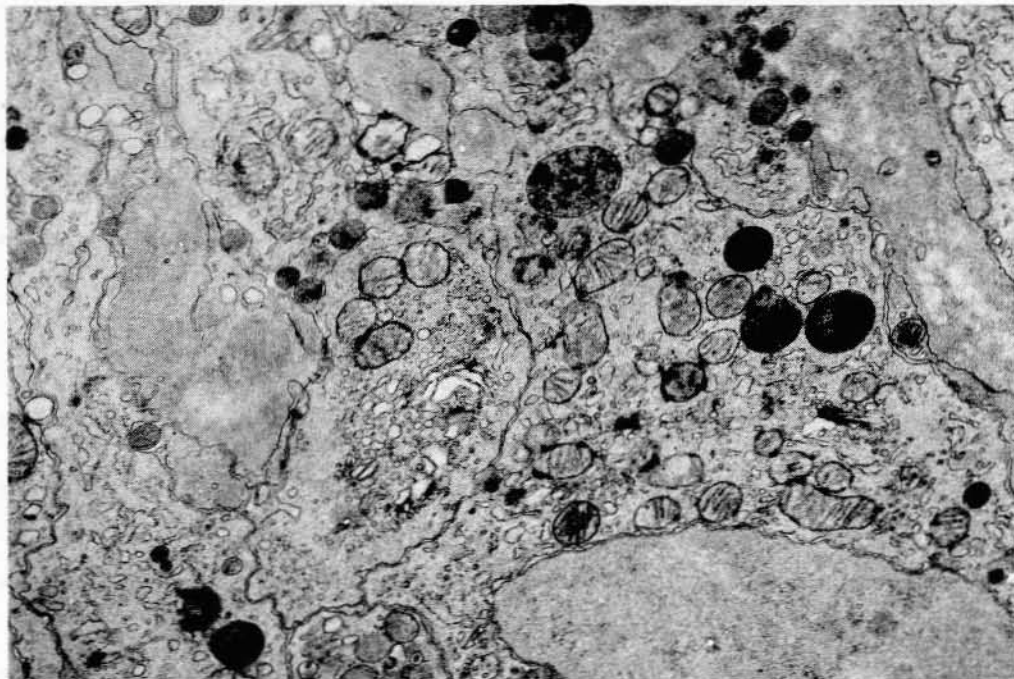


Figure 16 6 days after irradiation. Parts of several macrophages contain electron-dense remnants of phagocytized debris. The reticular macrophages otherwise appear normal ( $\times 11,400$ ).

図16 放射線照射後6日。少数の大食球の各部は、食作用により摂取された崩壊物から成る電子密度の高い残遺物を含む。その他の点では細網大食球は正常に見える ( $\times 11,400$ )。



## REFERENCES

### 参考文献

1. BENCOSME SA, KALNINS VI, STICH HF: Immediate and delayed effects of ionizing radiation on hepatic cells. Fifth International Congress for Electron Microscopy, ed by BREESE SS, Jr, New York, Academic Press, 1962. VV-2  
(脾臓細胞に対する電離放射線の即時および遅発性影響)
2. BRAUN H: Electron-optische Untersuchungen an Zellen des Dünndarm epithels nach Röntgen Bestrahlung. *Exp Cell Res* 20:267-79, 1960  
(X線照射後の小腸上皮細胞の電子光学的調査)
3. DAVIS JMG: Effect of roentgen rays on the ultrastructure of regenerating rat liver cells. *Acta Radiol* 58:129-40, 1962  
(ラットの再生肝臓細胞の超微細構造におけるX線の影響)
4. HAGER H, BREIT A, HIRSCHBERGER W: Elektronen-mikroskopische Befunde bei experimenteller Schädigung des zentralen Nervensystems von Säugetieren durch Röntgenstrahlen. *Strahlentherapie Sonderbände* 46:251-2, 1960  
(X線による哺乳類の中樞神経系の実験的損傷における電子顕微鏡検査所見)
5. LACY D, RATHBLAT J: Normal structure of spermatid nuclei and changes caused by ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 2:218-26, 1960  
(精子細胞核の正常構造および電離放射線によって生じたその変化)
6. LACY D, RATHBLAT J: Study of normal and irradiated boundary tissue of the seminiferous tubules of the rat. *Exp Cell Res* 21:49-70, 1960  
(ラットの細精管境界部組織の正常像および放射線照射後の像に関する研究)
7. PITCOCK JA: An electron microscopic study of acute radiation injury of rat brain. *Lab Invest* 11:32-44, 1962  
(ラットの脳の急性放射線傷害の電子顕微鏡的研究)
8. SEKI M, SEKIYAMA S, OTANI K: Electron microscopic observations on mouse spleen after total body irradiation. (Abstract) *J Electron-microscopy* 13:42, 1964  
(放射線全身照射後におけるマウス脾臓の電子顕微鏡的観察)(抄録)
9. SCHERER E, VOGELL W: Elektronenoptische Untersuchungen zur Strahlenwirkung auf Leber, Milz, und Niere. *Strahlentherapie* 106:202-11, 1958  
(肝臓、脾臓および腎臓に対する放射線の影響についての電子光学的調査)
10. BLOOM W, ed: *Histopathology of Irradiation from External and Internal Sources*. New York, McGraw Hill, 1948  
(外部および内部線源による放射線照射における組織病理学)
11. LUFT JH: Improvements in epoxy resin embedding methods. *J Biophys Biochem Cytol* 9:409-14, 1961  
(エポキシ樹脂封埋法における改善)
12. KARNOVSKY MJ: Simple methods for "staining with lead" at high pH in electron microscopy. *J Biophys Biochem Cytol* 11:729-32, 1961  
(電子顕微鏡検査法における高pH価“鉛染色”の簡単な方法)
13. WEISS L: A study of the structure of splenic sinuses in man and in the albino rat with the light microscope and the electron microscope. *J Biophys Biochem Cytol* 3:599-609, 1957  
(光学顕微鏡および電子顕微鏡による人間および白ラットの脾洞構造の研究)
14. WEISS L: The structure of fine splenic arterial vessels in relation to hemoconcentration and red cell destruction. *Amer J Anat* 111: 131-80, 1962  
(血液濃縮および赤色細胞崩壊の関係から見た微細脾動脈血管の構造)
15. MOORE RD, MUMAW VR, SCHOENBERG MD: The structure of the spleen and its functional implications. *Exp Molec Path* 3:31-50, 1964  
(脾臓の構造およびその機能)
16. MURRAY RG: Spleen. In *Histopathology of Irradiation from External and Internal Sources*, ed by BLOOM W, New York, McGraw Hill, 1948  
(脾臓、外部および内部線源による放射線照射における組織病理学)
17. SCHWARTZENDRUBER DC, CONGDON CC: Electron microscope observations on tingible body macrophages in mouse spleen. *J Cell Biol* 19:641-6, 1963  
(マウスの脾臓における可染体大食球の電子顕微鏡観察)
18. ANDRE-SCHWARTZ J: The morphologic responses of the lymphoid system to homografts. 3. Electron microscopy study. *Blood* 24:113-33, 1964  
(同種移植に対するリンパ系の形態学的反応)