

結核の組織反応に関する実験的研究

(第1編)

九州大学医学部第3内科教室(指導 沢田教授 貝田助教授)

白石正士

(昭和26年6月15日受付)

(本論文の要旨は第25回日本結核病学会総会及び第2回日本結核病学会九州地方会に発表した)

緒言

結核症の病理組織学的な追求は数多く行われているが、特にその特徴である結節の形成並びに Allergie に関する考察は、諸説入乱れて未だに定説を見ない。1891年 Koch¹⁾が、今日 Koch 氏現象として知られる有名な学説を発表して以来、Römer, Hamburger²⁾は直ちに追試を行つて、Koch 氏現象自体が侵入結核菌に対する防禦作用を持つ Allergie 反応の表現であり、反応自体に菌滅芽作用と菌の体内伝播阻止作用のあることを認めた。また Rist, Pagel³⁾等も、正常状態では菌は皮膚に膿瘍を形成し、Allergie 例においては蜂窩織炎となり、菌は断裂崩壊して早期に消失すると述べている。しかし Lewandowsky⁴⁾は再感染の場合も完全治癒を示さずに結節性病変の現れる場合のあることを指摘し、一次感染と二次感染の差異は単に量的のもので質的なものではないと言い、Zieland, Kalbfleisch 等もこれに賛成している。

結核症の特異的な変化として古くから注目されている結節の形成についても、従来種々の考察が払われている。Rössle⁵⁾は結核肉芽腫は Allergie 性炎症の特異な表現であるとし、Krause⁶⁾の如きは結核結節の存在なくしては Allergie なく特異的結核免疫もないと述べ Allergie と免疫とは平行し、不即不離の関係にあると強張している。武田教授及びその門下は結節形成は Allergie 性反応に他ならぬと言う⁷⁾。一方 Selter, Boquet, Calmette, Lange 等の如く Allergie と免疫とは必ず不即不離のものではないと唱える学者も少なくない。Sabin⁸⁾等は各種の結核菌菌体成分に対する組織反応を研究し、肉芽腫形生能力は一種の高級脂肪酸であるフチオン酸にあると述べ、Roulet⁹⁾も追試を行つてこれを認め、結核結節の形成は菌体の特殊な成分に対する直接的反応で、Allergie の有無とは無関係であると言う。

私は生結核菌、加熱死結核菌及び各種結核菌菌体成分を動物の皮下に注入しその組織反応を追求して、結核症の発病とその進展に際して重大なる関係があると考えられる Allergie と免疫について基礎的な考察を行い、さら

に結核結節の形成が如何なる機転で生ずるかを追求しようと考へて本実験を行つた。

実験方法

1 菌体成分の作用

使用菌は九州大学細菌学教室所蔵の人型結核菌フラックフルト株、鳥型菌 A₆₂. B.C.G.菌、チモテー菌を Sauton氏無蛋白培地に50日間培養したものである。これらの菌を主として Anderson¹⁰⁾等の方法に習い、コッホ氏釜で30分間加熱滅菌後濾紙でこし、数回滅菌生理的食塩水で洗い、さらに滅菌蒸留水で洗滌液が無色となるまで洗う。その後菌体を濾紙の上に拡げて充分に水分を吸収させ乾燥したものをエーテル内に入れ、Soxhlet 氏浸出器で約200時間浸出させ、浸出液を Reichel 型濾過器で濾過した。濾液を傾斜して水液層を分離し、なお水分を取除く為にエーテル層に少量の無水硫酸ソーダを加えて攪拌した後その濾液を濃縮し、同量のアセトンと

第1表

結核菌→30分加熱後乾燥→エーテル浸出——



注加すると、室温で粘着性の沈澱を生ずる。この沈澱物を傾斜してアセトンを去り数回アセトンで洗い、洗滌液は母液に混ぜておく。沈澱物を硫酸乾燥器の中で乾燥させると黄褐色粘稠な物質を得る。これを磷脂質1として実験に使用した。

次に磷脂質1を除いた残液を再び濃縮した後氷水中につけ、冷却して黄色の沈澱物(磷脂質2, これは実験に使用しなかつた)を除き、残液を濃縮し炭酸ガスを通じてアセトンを除くと、濃褐色油状の物質が残る。これを脂

肪とした。

エーテル浸出物を除いた菌体残査はクロロホルムを加えて約 30 日間時々振盪しながら浸出し、これを氷室内に 3 週間放置して分離された透明クロロホルム層を得、クロロホルムを重湯煎上で蒸発させた後炭酸ガスを通じて灰白色の臘脂質を得た。

鳥型菌、B.C.G. 菌、チモテー菌は同様の方法でエーテル浸出を行い、浸出液よりエーテルを去つてエーテル可溶成分(燐脂質 1, 2, と脂肪を含む)として実験に使用した。

2 菌液及び菌体成分溶液の作成

結核生菌、加熱死菌、脱脂菌は法に従い正確に 1 c.c. 中 10mg を含む浮遊液を造り、これを原液とし必要に応じて適時倍數稀釈して使用した。

燐脂質及び脂肪はエーテル、アルコール等溶液に溶解せしめた後振盪しながら徐々に滅菌生理的食塩水を加え、これを振盪しながら軽く熱してエーテル、アルコールをできる丈蒸発除去し、生じた生理的食塩水懸濁液を使用した。臘脂質はクロロホルムに溶解し、同様にして生理的食塩水懸濁液を造り使用した。

3 実験動物への接種

体重 400 乃至 500g の雄性海狸を Römer 氏反応陰性であることを確かめた後に使用した。前処置として人型結核菌フランクルト株(以降人 F と略称する) $1/50$ mg を海狸の左大腿外側皮下に注入し、30 日後 Römer 氏反応陽性であることを確かめ、これを結核感染海狸群とした。

結核感染海狸群と正常海狸群(以下×群、-群と略称する)をそれぞれ 2~4 匹宛に分け、その 1 群宛に各頭共背部に 6ヶ所ずつ人 F 結核菌 $1/50$ mg を皮下に注入した。同様にして人 F 結核菌及びその加熱死菌・脱脂菌・燐脂質 1・脂肪・臘脂質、さらには B.C.G. 菌・鳥型菌・チモテー菌のエーテル可溶成分各々 2mg の皮下注入群を作成した。その後毎日注射局所の変化を肉眼的に観察するとともに、経時的に 1~2ヶ所宛注射局所の皮膚をできるだけ広範囲に切り取り、パラフィン包埋法、チエロイジン包埋法により組織標本を造り、主としてヘマトキシリン、エオジン重染色及びテール氏菌染色を施して鏡検し、70~75 日後撲殺して内部臓器の変化を観察した。

実験成績

人型生結核菌 $1/50$ mg 注入実験

1 肉眼的所見

-群(未感染) 6 日目迄全く変化なく、7~8 日目局所に急に硬結を生じ、12~13 日目に排膿し、以後潰瘍を形成して 2ヶ月間の観察期間中治癒しない。1 匹又 15 日目迄全く変化なく 20 日目硬結を生じ、28 日目に排膿し、以後は全く他と同様の経過を示した。

+群(既感染) 3 日目既に硬結を生じたものがあり、

第 2 表 生結核菌 $1/50$ mg 接種の場合ツ反応の推移

海 狸 番 号	1 週	2 週	3 週	4 週	60 日
1	—	10×18	15×12	15×13	12×10
2	—	12×10	20×15	15×12	12×12
3	—	—	25×12	15×14	12×12
4	—	13×11	18×13	15×14	13×12
5	—	—	12×10	18×12	14×12

4 日目は殆んど硬結を示し、7~10 日目に排膿を見た。ただし 21 日目硬結を生じ、4 週目前後に排膿するものも少数あつた。なお 1ヶ月後殆んど瘰癧状となつて治癒するものと、一群と同様 2ヶ月の観察期間中硬結乃至潰瘍を残して治癒しないものと兩種類認められた。

2 組織標本所見

6 時間目 -群 皮下結締織は粗鬆となり少量の顆粒細胞の浸潤がある。既に結核菌が貪喰細胞に摂取されているのを見受ける。出血はあまり著明でない。+群 顆粒細胞の浸潤が-群より幾分著しい以外は全く同様の所見を呈する。

1 日目 出血像が著明となり顆粒細胞の浸潤が強く附局性となり、単球が出現してゐる。+群の反応像は-群より著しい。

3 日目 出血像著しく顆粒細胞の浸潤を増し、辺縁部に類上皮細胞が少数認められる。+群は顆粒細胞集団の中心部に核濃縮著しく、類上皮細胞も多く見られる。菌は顆粒細胞集団の中に多数散在している。

5 日目 類上皮細胞の浸潤が増し、特に+群に著しい。顆粒細胞は核濃縮、核崩壊による核層片の散在等の退行性変化を示すものを見る。

10 日目 +群は限界鮮明な結節性の浸潤を示し、中心部は顆粒細胞類上皮細胞赤血球の混じった肉芽腫を形成する。類上皮細胞は浸潤辺縁部に多く少数の淋巴球を認める。-群は限界不明瞭な瀰漫性の浸潤を示し類上皮細胞少く、菌は両群共に多数 1~数匹宛散在する。

15 日目 -群の浸潤も限局性となり+群との相違が少なくなり、両群共に中心部顆粒細胞の崩壊像が著明で輪郭の不鮮明なもの多く散在する核層片を見る。菌は両群共に著しく減少してゐる。

20 日目 両群共に崩壊像著明な顆粒細胞集団の周囲に類上皮細胞が多数出現し結節を形成する。両群共に病竈部が皮膚外表に破れて排膿している。

30 日目 堅々たる結節を形成し菌は殆んど消失してゐる。

45 日目 顆粒細胞が新旧入れて存在し、多数の類上皮細胞小円形細胞少数の紡錘形細胞を見る。類上皮細胞による結節の形成はますます著しく+群に広範な乾酪化嚢を認める。

人型生結核菌 2 mg 注入実験

1 肉眼的所見

一群 注射後生じた小豆大の硬結は3日目には大豆大となり硬さを増し、6～7日目急に硬結部は破れて排膿し以後潰瘍を形成し、60日間の観察期間中治癒しない。

+群 注射後生じた小豆大乃至大豆大の硬結は6日目急に排膿し以後潰瘍を生ずるが25日目頃には殆んど瘻痕治癒したように見える。しかし30日目頃再び局所は破れて排膿し潰瘍を造つて60日間の観察期間中治癒しない。

2 組織標本所見

6時間目 皮下組織は浮腫状を呈し主として顆粒細胞の遊出を見る。該細胞は $1/50$ mgの場合に比べ多量に遊出し密集している部分を見受ける。菌は無数に存在し、菌の多いところほど顆粒細胞も密集しており、菌の一部は胞体内に貪食されている。両群共に同様の所見を呈する。

1日目 一群は顆粒細胞の遊出増大し、+群はさらに皮下組織の浮腫残存し、顆粒細胞は血管壁の周囲に特に多い。

5日目 主として顆粒細胞の浸出を示し、類上皮細胞小円形細胞が少数ながら認められる。顆粒細胞は核濃縮核層片の散在等の退行変性を見受け所々に小出血像がある。+群は一群より細胞の遊出が多量で出血像が甚しい。結核菌は両群共に多数散在し貪食細胞内に摂取されているものを見る。

10日目 周囲組織との境界が明瞭な肉芽組織を形成し顆粒細胞の退行変性進行し、病竈辺縁部に類上皮細胞淋巴球が多量に出現している。菌は一群に細長いよく発育したものを多数認めるが+群では著減を示す。

20日目 両群共に扁平上皮細胞層の脱落があり、外界との接触面は顆粒細胞及び赤血球の混濁肉芽様を呈する。多数の類上皮細胞が集合して結節を形成している。菌は1視野に数個程度しか見えない。

30日目 新たに浸出した顆粒細胞及び赤血球が陳旧なものと混在し、類上皮細胞結節が多数散在する。小円形細胞紡錘形細胞を少量認める。+群は小乾酪化竈を多数に認める。菌所見は20日目に同じ。

45日目 30日所見と大差なく結締織化血管の新生を見ず+群は所々にエオジンに淡染した無構造様の乾酪化竈を認め30日目所見より拡大している。往々数個の類上皮細胞集合してラ斐型巨態細胞に類するものを見受ける。

人型加熱死結核菌 2 mg 注入実験

1 肉眼的所見

一群 注射後生じた米粒大の硬結は5日目頃より小豆大に腫張し8～10日目皮膚外表に破れて排膿し潰瘍を形

成するが直ちに痂皮を生じ硬結は次第に縮小し、14日目には米粒大となり20日目には瘻痕を残して治癒する。

+群 注射後生じた米粒大の硬結は4～5日目薄茶色に変化し、5～7日目に排膿する。その後硬結は急速に縮小して痂皮を形成し20日目には瘻痕治癒する。

2 組織標本所見

6時間目 主として顆粒細胞の浸出を見小円形細胞が少量混在する。+群は密集せる細胞が一つの集塊を造り一群は散在する多数の細胞集塊よりなる。菌は両群共に細胞集塊の中に多量密集して散在する。

1日目 顆粒細胞の浸出を増し小出血像がある。一群は皮下結締織に瀰漫性の細胞浸潤像を示し、+群は周囲との境界明瞭な浸潤像を呈する。

5日目 顆粒細胞は退行変性を示し菌は数十匹宛密集して散在する。+群は出血及び類上皮細胞浸潤が一群より著しく、表皮の欠損を見菌量が著減している。

10日目 両群共に類上皮細胞の浸出血が著明で顆粒細胞と混じた肉芽竈を形成している。類上皮細胞は+群に多く、菌は一群では多数の集塊を見るが+群では殆んど消失している。

20日目 両群共に類上皮細胞結節を形成し、顆粒細胞は殆んど退行変化している。浸潤辺縁に紡錘形細胞の出現が多く、菌は両群共に殆んど見出し得ない。

30日目 両群共に顆粒細胞は激減し、出血竈も陳旧性のものだけとなり結締織繊維の増殖が甚しく、血管の新生を見る。類上皮細胞様の核が数個集合して、あるいは花環状に排列して巨態細胞状を呈するものもあるも、典型的なのは認められない。

45日目 両群共に類上皮細胞紡錘形細胞淋巴球が美しく排列して広範な浸潤像を呈し、纖維化著しく毛細血管の新生を見る。

考 按

Koch が1891年正常海狸と結核海狸に結核菌を接種した場合に生ずる組織反応の相違を指摘して以来、これは Pirquet の Allergie 反応の典型的なものとされ、多数の学者の追試により、Koch 氏現象こそ結核の Allergie 免疫さらには結核症の本態を究明する鍵とされてきた。結核症の Allergie と免疫に関しては免疫学的病理学的領域は勿論、臨床的方面等のあらゆる角度から検討され、その業績は甚だ多い。私の得た成績も概ね諸家の研究と一致するものであるが、実験方法をやや異にし従つてその結果も必ずしも一致しないところがある。

結核生菌 $1/50$ mg を接種した実験で肉眼的所見において、Koch 氏現象に比べ一部では硬結潰瘍が正常海狸では早期に、結核海狸では遅れて出現するという時間的ずれを生じた。この現象は恐らく結核海狸では抗原過剰の爲抗体の不足を招来し、Allergie 反応が Koch 氏現象のように急激に起らずに遅延し、正常海狸では抗原過剰

のために抗体を早期に多量に生じ Allergie の獲得が早く組織反応が早期に現れたものとも考えられる。結核海狸の再感染竈で生菌 $1/50$ mg 注入の場合治癒しないものがあり、2 mg ではすべて一応治癒したかに見えた病竈が潰瘍を生じて治癒しなかつたが、これは Lewandowsky が再感染竈の場合完全治癒に至らず結節性病変の残ることがあると指摘しているのに一致する。

組織標本所見では結核菌 $1/50$ mg 接種後最初に起るのは著明な多核白血球の浸潤であり、3日目頃には類上皮細胞が出現し始め、結核海狸では10日目に結節の形成を見、15日目頃より正常結核海狸共に結節の形成著しく両者の差異は少なくなり、結核菌も相前後して激減する。以後45日目迄の観察期間中病変は治癒に至らず、45日目所見では結核海狸に広範な乾酪化竈を認められる。すなわち細胞の浸潤は初期に結核海狸に著しいが、15日目以後は大差を見ず、両者の間に本質的な相違は認め難く、量的な相違と思われ、結核海狸では肉眼的には治癒したように見える30日目以後に組織標本で著しい結節の形成乾酪化が証明される。正常海狸に乾酪化を見なかつたがこれは観察期間の短いためと思われ、早晚乾酪化が起るものと予想される。

菌量により組織の反応に相違を生ずることは Koch 自身が認めているところで、Hamburger も結核海狸に微量菌を再感染させた場合、注射局所病変は肉眼的には殆んど証明し難く免疫の表現をとると言う。鍋島¹¹⁾は $1/10^6$ ~ $1/10^8$ mg という微量の菌を海狸に接種した場合、ツ反応は数ヶ月後陽転するが発病を見ずに免疫の過程をとり、初感染竈は治癒し内部臓器の変化も軽微で治癒するものが多いと言う極めて興味ある結果を報告している。私の実験でも生結核菌 2 mg を接種した場合は $1/50$ mg の場合と趣を異にし、両群の間に肉眼的には早期に差異を認め難く、しかも結核海狸の再感染竈は25日目頃一度治癒したように見えたが直ちに潰瘍を形成し、60日間の観察期間中治癒しなかつた。これは一見菌量の如何に関せず初感染竈は速かに治癒するという Koch の見解に反するようであるが、多量菌の再感染に際しては抗原に対する抗体の不足のため Allergie 性の炎症の結果全部の菌を死滅させることができず、残存した菌が再び炎症を惹起したものと考えられる。組織標本では $1/50$ mg 接種の場合と本質的な相違はなく、5日目迄は結核海狸に細胞浸潤が多量であるが、10日目より両者の像は殆んど差異なく、30日目以後では結核海狸に乾酪化竈を認めた。

加熱死結核菌を使用した実験も多く、Sternberg¹²⁾は大量の加熱死菌を静脈内に注入し乾酪化を証明してこれを菌体の特殊作用に帰し、Panow¹³⁾は死菌は化学的毒素を持ち、これが結節形成乾酪化に与るが後には結締組織の増殖を来すと言う。しかしこのような死菌による乾

酪化は否定し結節は形成するが乾酪化を示さずに繊維性となり治癒するという人が多い。Prudden¹⁴⁾、Kelber¹⁵⁾、Baumgarten¹⁶⁾、Kraemer、Engelhardt¹⁷⁾等はいずれも死菌による乾酪化を否定し、就中 Baumgarten は Sternberg 等のいう乾酪化を菌塊又は培養基物質の肺血管腔塞によるとなし死菌の特殊作用ではないと述べ、Kelberはこの結節形成を Knötchenkrh,d, indifferenter Natur とさえ名付けている。最近においても Sabin、Bickford¹⁸⁾、Thomas¹⁹⁾、糸川²⁰⁾、原沢²¹⁾、渡川²²⁾、森²³⁾等の業績があり、Thomas 以外はすべて類上皮細胞巨細胞等を有する結核結節は認めているが乾酪化は否定している。

私の実験では正常及び結核海狸に加熱死菌を接種した場合、肉眼的に初期には非定型的な Koch 氏現象を示すが20日目には両者共瘰癧治癒する。組織標本所見で皮下注入後著しい中性多核白血球の反応が起るのは全く生菌と規を一にし、5日目所見で結核海狸は既に排膿し、正常海狸に比べ白血球浸潤著しく出血も多く菌は減少しているが、10日20日と経過するにつれて両者の差異は認め難くなり、30日目以後では殆んど同じ所見を呈する。すなわち20日目には両者共に類上皮細胞より成る結節を形成しているが、繊維化の傾向が顕著であり、結節も大小不同で淋巴球少なく、30日40日と経過するにつれて血管の新生増殖が見られ中性多核白血球は浸蝕され皮下結締組織の増殖著しく、結節は類上皮細胞淋巴球が混じて美しい排列像を示すに至る。菌も結核海狸では10日に消失するが20日目には両群ともに発見できなくなる。この間2、3の学者の述べるような乾酪化は全くこれを認めず、かつ一旦結節を形成しても速かに白血球は減少し著しい繊維化を招来して治癒に至り、生菌注入の際白血球竈が消失せず新旧多様の結節を形成して乾酪化を生じ、繊維化が見られず治癒傾向のないのに比べると著しい相違と言わねばならない。以上の点より死菌による乾酪化を主張する Sternberg、Panow、Thomas 等の説は実験方法の相違を考慮しても肯定し難く、Baumgarten、Kraemer、Engelhardt、Bickford、Sabin、糸川、原沢、渡川、森等の主張に賛成するものである。

加熱死結核菌による結節形成は諸家すべてこれを認めているが、それが結核の毒素による特異作用かあるいは単なる異物反応と解すべきかの点についてはまちまちで定説を見ない。特異作用とする者に Mafucci²⁴⁾、Prudden、u、Hodenpyl、Straus、u、Gamaleia、Wasur、Abel²⁵⁾、Krompecher、原沢、中村、新井²⁶⁾があり、異物反応とする者に Kelber、Visman²⁷⁾、Baumgarten、Klett、森がある。原沢は加熱死菌を白鼠皮下に注入し結核様結節を得たが死葡萄状球菌では単純炎症を生ずるのみであることより、加熱死菌による結核様結節を特異的と主張している。ただし結節は後に繊維化して瘰癧治癒す

ると言う。森は死菌の皮下注入時に生ずる結節は大小不同形状極めて不規則であり、これは組織の纖維化の途中に随伴偶発したに過ぎずかつ多数の血管新生を認め乾酪化なく巨態細胞少なく淋巴球の遊出軽度で一定の配列を示さない点より、上記病変は結核菌に特有な毒素に基くものでなく単なる異物反応に過ぎぬと強調している。私も森と殆んど同様の所見を得たが、結節は纖維化の途中偶発したと言うよりは、纖維化が高度でない3~5日目頃より発現し20日目頃最も著明な結節形成を見、纖維化高度となるにつれ類上皮細胞はむしろ減少して疎に排列し他の細胞が比較的が多くなつてくる。巨態細胞は生菌死菌いずれの場合にも6~7週の観察では殆んど出現を見ない。生菌の場合は注入局所において排膿を見た後も残存する菌は絶えず分裂増加しそれに比例して産生される毒素も多いと思われ、死菌の場合排膿により著しくその数を減じ、かつ残存する菌は増殖せずに日毎貪喰され注入当初死菌に含まれた毒素も減少の一路をたどるのに比べれば毒素の量的差異は多大であると考えられ、組織反応の相違もまた当然の帰結であろう。伊藤²⁸⁾は結核結節の形成に際し伴う浸出性の病変を結核菌毒素の作用に歸し、結節形成のような増殖反応を菌体の異物刺激によるとしているが、これは主客転倒の感がありRössle

も結核において特異的なものは Grannlom であつて浸潤性病変ではないと述べている。なお死菌注入後のツ反応は陽性の成績を得、一度陽性になつた後は2ヶ月後もその強さは殆んど変化なく存在した。かつ死菌による免疫力の獲得も多数の学者の認めるところであり、死菌の特異的作用は否定し得ないところである。しかし結節形成はまた別の問題に屬し、組織学的には菌体内毒素による特異作用とは思われず、異物刺激に基くものと思われる。

結 論

結核及び正常海狸に生結核菌 $1/50$ mg, 2 mg, 死結核菌 2 mg を皮下接種した場合、非定型的 Koch 氏現象を惹起した。

生菌による一次感染と二次感染との間の組織反応には質的な差異は認められず量的なものと思われる。

死菌によりツ反応は2ヶ月後も陽性の成績を得た。然し死菌による結節形成は菌体毒素による特異的なものとは考え難く、生菌の場合とは著しくその趣を異にし、異物の機械的・化学的刺戟に基き生じたものと考えられる。

文 献

第2編に一括して記す。