

原 著

肺結核病巣の組織発生に関する 組織化学的研究

第Ⅱ報 モルモット肺における結核 病巣発生の組織化学的研究

大阪大学医学部第三内科学教室(主任 堂野前維摩郷教授)
大阪大学微生物病研究所竹尾結核研究部第2部(主任 堀三津夫 助教授)

服 部 正 次

(昭和28年9月14日受付)

(本論文の要旨は第28回日本結核病学会総会、及び
昭和28年5月大阪大学医学会において報告した)

緒 言

筆者は第Ⅰ報において人肺結核病巣の核酸、アルカリ性ホスファターゼ、酸性多糖類などについて報告したが、今回はモルモット肺における結核病巣の組織発生を経時的に組織化学的に研究し、類上皮細胞の発生及びセニ生成の問題などを検討した。

実 験 方 法

体重300g前後でレーメル氏反応陰性の健康モルモットを2群に分ち、1群には人型結核菌高垣株(3%グリセリン寒天に4W.培養)を $1/1000$ mg宛気管内に感染し、他群には同じ菌を $1/50$ mg宛気管内に感染し、菌感染後経時的に(2, 6, 12, 24, 48, 72時間, 4, 7, 14, 21, 30日)出血死させ、その肺及び心を組織学的に検索した。

固定は純アセトンに24時間氷室固定後、アセトンを新しくして24時間室温固定した。包埋はこれを直ちにキシロール、キシロール・パラフィンにうつし、 56°C にてパラフィン包埋した。切片はいずれも8ミクロンで、接齧剤は用いながつた。

染色は第Ⅰ報と同じであるが、これにArmitage氏Per Oxydase反応とリチオン・カルミンによる生体染色とを附加した。

実 験 成 績

Ⅰ ヘマトキシリン・エオジン染色所見……総括的に略記する。すなわち人型結核菌高垣株を $1/1000$ mg或いは $1/50$ mg気管内注入した場合、程度の差はあるがモルモット肺の病変は、小気管枝のカタル性変化、肺組織の充血及び肺胞上皮細胞の膨化をもつて始り、これらの変化の増強と共に、多核白血球(偽性エオジン嗜好)の滲出遊走及び、肺胞壁小血管並びに毛細血管周囲で分葉状核を有する単球の増殖がはじまり、気管枝側淋巴濾胞と小血管周囲淋巴小濾胞も肥大し、菌感染6~12時間後には、小血管及び毛細血管内にあらわれる分葉状核を有する単

球が著明に増加し、これらは血管外膜位で無糸分裂によつて分裂増殖し、核も膨化して明るい大単球となる。肺胞壁は充血、肺胞壁細胞の肥大、大単球の増殖などによつて肥厚し、一方多核白血球の滲出も強くなる。菌感染24時間~4日後では大単球増殖による肺胞隔肥厚は益々強く、増殖性間質性肺炎の像を呈し、小気管枝に接する単球増殖巣内には既に類上皮細胞が出現し、一方出血性カタル性肺炎の如き非特異性滲出炎も依然として存在する。菌感染7日後では非特異性滲出炎は徐々に消退し始め、2週~3週後には殆んど消退し、小さいが定型的類上皮細胞結節形成をみ、又大単球の慢性増殖は益々強くなつて大単球が類上皮細胞に移行する像が明らかになってくる。菌感染1月後には、小さいエシを有する小結核結節をみ、セニ化の傾向を示し、慢性の大単球増殖巣にも類上皮細胞が多くなり、特異性炎の像が強くなる。

Ⅱ 組織化学的所見

1) 気管枝……気管枝上皮細胞は菌感染2時間後では核色質がうすく、仁は認められないものが多く、細胞質のRNAはかなり豊富であり、アルカリ性ホスファターゼ(以下A.P.と略記)反応は細胞質に弱陽性である。菌感染6時間以後気管枝腔内に上皮細胞が剝離脱落したもので、RNAはうすいか認めなくA.P.活性も殆んど認めない。しかし菌感染12時間以後には気管枝上皮の剝離脱落した部分に上皮細胞の重畳状の再生像を認めるが、これら細胞はRNAの濃い、かなり大きな仁を1個有し、細胞質のRNAもこく、核のDNAも濃い。そのA.P.反応も細胞質に強陽性である。粘液を分泌する杯状細胞などはDNA、RNAともに濃く、細胞質のA.P.活性も強い。

Hotchkiss氏染色(以下H.染色と略記)では円柱上皮細胞層は陽性で、気管枝腔内の粘液も強陽性である。トルイデン・ブルーによるメタクロマジー(以下M.と略記)は円柱上皮細胞のところどころと、粘液などがい

ずれの pH 域でも、うすいピンク色を呈し、ヒアルロニダーゼ作用はうけない。気管枝を囲む軟骨板はメチルグリーン・ピロニンで基質が柿赤色に染り、H. 染色では軟骨細胞の細胞質、軟骨基質ともに強陽性で、M. は pH 1.04 でも基質は強くピンク色を呈する。しかしヒアルロニダーゼを充分 (1000/cc TRU 生理的食塩水, 38°C, 2時間) 作用させた時には、気管分泌物や肥肝細胞と異なり軟骨基質の M. を呈する物質は分解される。軟骨細胞は A.P. 反応弱陽性であるが、軟骨基質や気管枝内分泌物は陰性である。気管枝周囲の鬆結結合組織の間質は人肺の場合と同じく (第 I 報参照) ヒアルロン酸を含む。

2) 肺胞上皮細胞……いわゆる肺胞上皮細胞は菌感染 2 時間後で既に円柱状・骰子状に膨化したものを各処に認め、このものは仁が 1 個で RNA が濃く、細胞質の RNA もかなり濃厚で、DNA も豊富である。又 A.P. 活性は細胞質にかなり強い。H. 染色も細胞質に陽性である。菌感染 6 時間以後では肺胞腔内に剝離脱落しているものが多くなり、結核菌やカルミン粒子の貪喰能は膨化した肺胞上皮細胞や、肺胞壁近くに存在する細胞質のせまい剝離単球よりも、細胞質の広がった剝離単球の方が旺盛である。これに反して核酸量は次第に減少し、細胞質の広い大単球では、RNA は細胞質には殆んど認めず、1 個の仁の中に僅かに認められる。A.P. 活性も次第に減弱する。しかし H. 染色は剝離単球にも細胞質に陽性のものが多く、陽性度と貪喰能の関係は認められない。

3) 血管内外にみる細胞……まず肺の小動脈や毛細血管内にみられる単球を核酸の染色性から便宜上次の如く区別する。(下図)

これらの単球についてその出現状態をみると、

(a) 型の大きな単球はいずれの時期にもごく少数認められ、菌感染後の時期によつて増減なく、又血管外に遊走しているような像もみられない。

(b) 型の単球は菌感染 2 時間後にも認めるが、菌感染

12 時間後から肺胞壁小血管及び毛細血管内に著明に多くなり、毛細血管内には特に多い。そして血管壁にくっついたり、血管外膜位に出て、その周囲に類上皮細胞の前段階と考えられる大単球が盛んに増殖している。

(c) 型の単球は (b) 型と同じく、菌感染 12~24 時間の間で著明に多くなり、1 カ月後に至るまで常に多数存在している。そして血管外膜位に出た (c) 型単球と、核が一層膨化し明るくなつた類上皮細胞に移行すると考えられる大単球との間に種々の移行型をみる。移行型を示す単球の仁はやはり 1~2 個あり RNA がこく、細胞質の RNA はうすいものも、濃いものもある。

(d) 型の単球は各時期を通じて少数認められ、あまり増減がなく、血管外に出て増殖しているような像を認めない。

(e) 型の単球は各時期を通じて認められるが増減がない。

以上の単球や多核白血球の出現の割合や核酸の染色性は右心房内でも全く同様である。

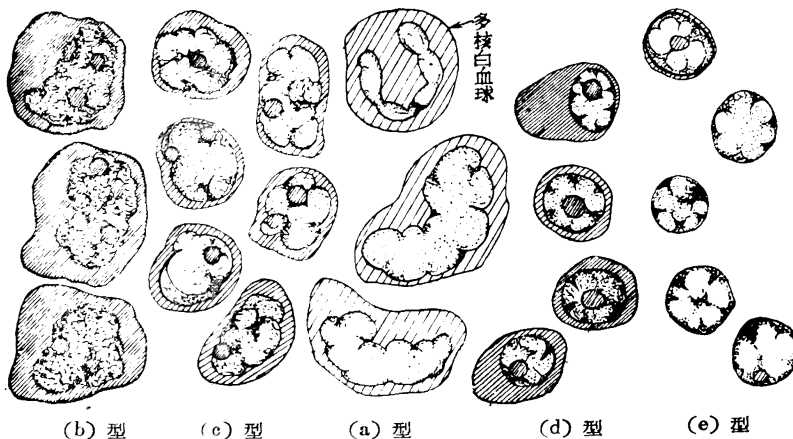
次にこれら単球の A.P. 反応は、(a) 型ではあまり強い活性を示さず、(b), (c), (d) 型では細胞質に活性強く、ことに (b), (d) 型に強い。(e) 型では殆んど活性を認めない。多核白血球は細胞質に活性を示すものと、全く活性がないものがあり、前者の方が出現率はやや多く、その活性の程度は (a), (c) 型より強く、(b), (d) 型の活性と同程度かやや弱い。これらの関係は右心房内でも同様である。次にペルオキシダーゼ反応は、核型からみて、(a), (b), (c) 型と考えられる単球の細胞質に陽性であり、(d), (e) 型は陰性で、多核白血球の細胞質は強陽性である。

次に血管内皮細胞は各時期を通じて、時に膨化していることもあるが、すべて配列は正しく、分裂または増殖の像はみられない。核酸染色では細胞質の RNA は常に淡く、仁は 1 個認めることが多いがその RNA はうす

い。A.P. 活性は核には陰性であり、細胞質には陽性のことが多く、かなり強陽性のこともある。

小動脈・中動脈の中膜位は人の場合と同じくやはりヒアルロン酸を含む (第 I 報参照)。

血管外膜周囲には肥大したリンパ濾胞があり、その内外には核酸染色で、(b) 型、(c) 型に属する単球と区別できない単球が多くみられ、これらの単球の周囲には既述の如く膨大核を有す



但し点描はメチルグリーンの染色程度をあらわし、斜線はピロニンのそれをあらわす

る大単球が増殖しており、血管から遠心的に遠ざかるにつれて核は大きなものが多くなるが、血管からかなり離れたところでも分裂しているような像を呈する。しかし有糸分裂の像はみられない。又これら単球が分裂増殖しているようなところでは細胞質の A.P. は常に活性が強く、H. 染色も陽性である。

4) 単球増殖巣及び結核結節……菌感染 2 時間後から肺末梢部の肺胞壁小血管及び毛細血管外膜位では既述の如く単球増殖が認められるが、菌感染 12~24 時間頃から、その増殖は一層明らかとなり、肺胞壁は各処で肥厚し肺胞隔炎の像を呈し、小気管枝に接する単球増殖巣内にはすでに類上皮細胞が出現する。菌感染 4~7 日後では肺胞壁肥厚は益々強く、定型的類上皮細胞も各処に認められるようになる。2~3 週後からは肺胞壁に増殖した大単球は小さいが結節状に集合する傾向を示し、類上皮細胞結節を形成し、時には巨細胞も認められ、又ごく小さいが中心部にエシも認められる。しかし今回の実験ではセンイ芽細胞の著明な増殖はみられなかった。

さて大単球増殖巣にはまばらな細い嗜銀センイが存するが、この部の基質 (Ground Substance) は pH3.5~3.8 からアルカリ側で、僅かにピンク色に M. を呈し、ヒアルロニダーゼ作用をうける。類上皮細胞結節の基質の M. もこれと同様であるが、網目状の嗜銀センイが存する場合には、基質の M. も一層著明で美しいピンク色を呈する。大単球、類上皮細胞及び巨細胞の細胞質及び核は普通 M. を呈さないが、時に核が pH4.1 前後から、うすい紫色に M. を呈することがある。しかしこの M. はヒアルロニダーゼ作用によつて変化をうけない。又 pH1.04 ですでに強い M. を呈する肥胖細胞が、上記の単球増殖巣内に点在し、菌感染 24 時間後に類上皮細胞及びセンイ生成をみた単球増殖巣内には殊に多数認められた。

H. 染色では肥胖細胞の細胞質は強陽性で、上記の単球増殖巣・類上皮細胞結節などの嗜銀センイ間質も弱陽性である。又増殖大単球・類上皮細胞・巨細胞の細胞質に陽性で、ベスト氏カルミンによるグリコーゲン染色でもこれら細胞の細胞質に陽性で、殊に巨細胞では著明である。しかし切片を充分水洗して、グリコーゲンが染らなくなつた標本でも巨細胞の H. 染色陽性物質は依然残存している。

核酸の染色では、血管外膜位に存する (b) 型、(c) 型単球 (3) を参照)、これらのまわりに増殖している大単球と類上皮細胞との間にはいろいろの移行像を認める。類上皮細胞は大型の定型的なものでは仁及び細胞質の RNA がうすく、大単球との移行型にある小型のものでは仁及び細胞質の RNA が濃い。又完全に嗜銀センイで囲まれている類上皮細胞よりも、嗜銀センイがまばらな大単球増殖巣にみられる類上皮細胞の方が RNA が濃厚である。ラ氏型巨細胞では核 1 個に対し RNA の濃い仁をそ

れぞれ 1 個ずつ有する核集団に接して、細胞質の RNA が殊に濃く、膨大して DNA もうすい核のまわりには RNA も殆んど認められない。

A.P. はこれら大単球・類上皮細胞・巨細胞の RNA の濃度の高い細胞質に活性が強く、巨細胞では核集団に接する部分の細胞質に特に活性が強い。

エシ集はメチルグリーン・ピロニンでは核崩壊・核濃縮に陥つた核片のみが染り、これは殆んどが高分子の DNA を含んでいる。A.P. 反応は陰性である。H. 染色は常に陽性だが、グリコーゲン染色は陰性である。又 M. もおこらない。すなわち第 I 報に述べた所見と全く同様である。

総 括 と 考 按

I ヘマトキシリン・エオジン染色所見について

気管内に結核菌を注入した場合に多核白血球の游走と同時に肺胞壁に大単球の増殖が起るが、これは Muckenfuss¹⁾, Sprunt²⁾, 木下³⁾, 広田⁴⁾ などが細菌・ウイルス・毒素・生理的食塩水などを気管内注入して観察した如く、肺組織の非特異的な増殖性反応である。しかしこの増殖単球が更に類上皮細胞に移行することは、Vorwald⁵⁾, 広田⁴⁾, Sabin⁶⁾, 天野⁷⁾, 塚田⁸⁾ 等多くの学者が認めており、筆者もヘマトキシリン・エオジン染色で増殖大単球から類上皮細胞への移行像を追求しえた。

II 類上皮細胞発生について

上述の如く増殖大単球から類上皮細胞に移行することは核酸の染色、A.P. 反応、H. 染色にて更に明らかに認められるが、ここではその増殖大単球がどこから生ずるかにつき考按する。

血管内の単球は既述の如く (a)~(e) 型に大別したが (a) 型の単球は核酸濃度がうすいこと、結核菌感染後の時間的経過に関せず、血管内に現われる比率に変動のないこと、Koller⁹⁾ の癌細胞における実験、及び Thorell¹⁰⁾ のいう如く幼若白血球は RNA 含量が多いが、成熟白血球は RNA を殆んど含まず、筆者の実験でも肺内でみられる多核白血球はすべて RNA を殆んど認めないことから類推して (a) 型単球は老化型とみなすのが妥当であろう。

(b) 型単球は仁を数個有し、RNA は仁、細胞質共にこく、顆粒状に染ることが多く、ペルオキシダーゼ反応陽性であり、単球増殖の時期に一致して血管内に多く現れ、血管外に出て、そのまわりに大単球の増殖をみること及び単球芽細胞についての天野¹¹⁾ の記載などから、その大部分が単球芽細胞であると考えられる。

(c) 型単球は、核の分葉状態、ペルオキシダーゼ反応陽性であること、血管外で大単球への種々の移行像をみることなどから、天野¹²⁾ などの血中単球、すなわちモチーテンの幼若型と考える。(d) 型及び (e) 型単球は、核型、ペルオキシダーゼ反応陰性であること、血管

外に出て分裂増殖している像をみないことなどから淋巴球系に属するものと考えられる。

以上の単球は右心房血中にも同じ割合で認められ、このうち (b) 型, (c) 型の単球が肺の毛細血管及び小血管から血管外へ出て既述の如く、類上皮細胞に移行することが、核酸の染色, A.P. 反応, H. 染色, グリコーゲン染色, ペルオキシダーゼ反応などから追求できるので、類上皮細胞は血中単球からも生じうることが組織化学的にも明らかにした。

Ⅲ 類上皮細胞・巨細胞とセンイ生成について

第Ⅰ報において類上皮細胞・巨細胞がセンイを生成することを組織化学的に想像し得たが、今回の実験で核酸染色により、周囲に嗜銀センイが著明に生成されている単球乃至類上皮細胞では、仁及び細胞質の RNA は濃く、巨細胞では周囲に嗜銀センイが著明に生成されている場合も、そうでない場合でも細胞質に RNA が濃く、これは核集団に接して特に濃い傾向があり、仁の RNA も濃くて核 1 個につき 1 個宛存在するのが普通である。又これら細胞の A.P. 反応も上記の RNA の存在位置と平行的に活性が強いことと、人肺でみた如く (第Ⅰ報)、膠原化した太いセンイで囲まれた巨細胞や類上皮細胞では、その核酸の濃度、A.P. 活性が少なかつたことから、これらの細胞のセンイ生成能を証明しようとする。また巨細胞は周囲のセンイ生成の如何に関せず核酸殊に RNA が豊富であり、同時に A.P. 活性が強いこと及び H. 染色陽性で、この部に一致してグリコーゲンが多いことなどから、巨細胞が単球核の分裂後、細胞質の分裂が停止して生じたとする Sabin¹³⁾、Oppenheimer¹⁴⁾、Timofejewsky¹⁵⁾ 等の説は組織化学的にみて妥当であると考えられる。

次にこれら細胞増殖巣の細胞間質或いは嗜銀センイの間質などにヒアルロン酸を主とする酸性多糖類があり、ここに肥胖細胞が認められるが、センイ生成の著明な場処には肥胖細胞が多く認められることから、嗜銀センイが生ずる場合、基質 (Ground Substance) としては、ヒアルロン酸を主とする酸性多糖類が考えられ、その生成には肥胖細胞或いは血中のヘパリンが何等かの役割を演じていると想定される。この場合単球増殖巣・結核結節などでは大単球・類上皮細胞・巨細胞などによつて蛋白が盛んに合成され、これと周囲組織の酸性多糖類とが何等かの作用をしてそこにセンイを生成するものと考えられる。最近 Morrión¹⁶⁾ もヘパリンを用いて試験管内でセンイ生成実験を行つているが、筆者の今回の成績と併せて考えると興味深い。しかし肥胖細胞とヒアルロン酸との関係は明らかでなく、今後の研究が必要である。

なおモルモットでは充分にヒアルロニダーゼを作用させると、気管枝軟骨板の M. 物質は消失し、その場合でも気管枝粘液・肥胖細胞などの M. 物質は残存するので、

モルモットの軟骨には Meyer¹⁷⁾ の分類によるヒヨンドロイチン硫酸 A を含むと考えられる。

Ⅳ 核酸とアルカリ性ホスファターゼの関係

気管枝粘膜が盛んに粘液を分泌している時期の気管枝上皮細胞・気管枝上皮が剝離脱落した後におこつた上皮細胞の重畳状の再生像・円柱状ないしは骰子状に膨化し、或いは剝離脱落した肺胞上皮細胞・肺胞壁小血管及び毛細血管外膜位で分裂増殖している単球・大単球・類上皮細胞及び巨細胞と周囲のセンイ生成との関係等で見られたように、核酸量の増減殊に仁及び細胞質の RNA の増加と A.P. 活性の強さとは時間的にも位置的にも常に平行関係があり、核酸と蛋白合成の関係を考へて興味あることと思われる。しかし今回の A.P. は β -グリセロ磷酸ナトリウムを基質にした場合の成績であるから、蛋白合成と直接的には意味づけられない。

脱パラフィンした切片と、脱パラフィンしない切片とを、同時に A.P. 反応を行うことにより、核には A.P. 活性を認めないことを知り得た。すなわちこれ迄、核に A.P. 活性が強いとされていたのは人工的沈着物を見ていたための誤りであることが証明され、これは Feigin¹⁸⁾、Gould¹⁹⁾、Goetsch²⁰⁾ 等の成績と一致する。

血管内皮細胞や多核白血球 (偽性エオジン嗜好) の細胞質では、RNA は前者では少なく、後者では殆んど染らないにもかかわらず、その A.P. 活性は強い場合が多いことなど、A.P. 活性は必ずしも核酸量とのみに平行関係があるものではない。多核白血球は肺でも心内で見えるものでも細胞質の A.P. は強い活性を有するものが多いが、これと活性を認めない多核白血球との出現率は肺でも心内でも同様であるから、局処すなわち炎症巣で A.P. 活性が強くなつたとは思えない。なお多核白血球の A.P. の意義に関しては Kerppola²¹⁾、宇都宮²²⁾ などの報告があるが、今回の実験でも明らかにし得なかつた。

結 論

1) モルモット肺結核病巣の今回行つた染色所見は大体、人肺結核病巣の染色所見と同様である。但し、モルモット気管枝の軟骨は Meyer の分類によるヒヨンドロイチン硫酸 A を含む。

2) 類上皮細胞及び巨細胞は血中単球からも生ずることが組織化学的に証明される。

3) 類上皮細胞及びランゲハンス氏巨細胞はセンイ生成能を有し、1・2-Glycol 基を有する基質 (Ground Substance) 中にセンイを生ずる。

4) 1・2-Glycol 基を有する基質の主体をなすのはヒアルロン酸であるが、肥胖細胞はセンイ生成と密接な関係がある。

5) 多核白血球 (偽性エオジン嗜好) の A.P. 活性は局処すなわち炎症巣で強くなつたのではない。

6) 細胞の分裂増殖、粘液分泌などの時期には核酸殊

に RNA が増量し, RNA の増減と A.P. 活性の増減とは平行関係にある。しかし多核白血球(偽性エオジン嗜好)や血管内皮細胞ではこの平行関係は認められない。

7) A.P. は β -グリセロリン酸ナトリウムを基質とした場合に,細胞質内で活性を示し,核には活性を認めない。

稿を終るに臨み御懇篤なる御指導並びに御校閲を賜った堂野前維摩郷教授,堀三津夫助教授に深く感謝致します。

文 献

- 1) Muckenfuss, R.S., Mc Cordock, H.A. and Harter, J.S.: Am. J. Path., 8: 63, 1932.
- 2) Sprunt, D.H.: J. Exper. Med., 62: 73, 1935.
- 3) 木下良順: 病理学雑誌, 2: 151, 昭 18.
- 4) 広田慶一: 未掲載(各種結核菌気管内注入による結核性肺炎発生の病理学的研究)
- 5) Vorwald, A. J.: Am. Rev. Tuberc., 25: 74, 1932.
- 6) Sabin, F.R.: Am. Rev. Tuberc., 25: 153, 1932.
- 7) 天野重安: 第 15 回結核研究会特別講演, 昭21年 12 月.
- 8) 塚田英之: 結核, 26: 5, 65, 107: 1951.
- 9) Koller, P.C.: Symp. Soc. Exp. Biol., 1: 270, 1947.
- 10) Thorell, B.: Acta Med. Scand., 127: 334, 1944.
- 11) 天野重安: 日血会誌, 6: 269, 1942.
- 12) 天野重安: 血液学の基礎(上巻), 296頁, 420頁, 1948.
- 13) Sabin, F.R., Doan, C.A. and Forkner, C.E.: J. Exper. Med., Supplement No. 3: 52, 1930.
- 14) Oppenheimer, R.: Virchows Arch., 194 (Beihft): 254, 1908.
- 15) Timofejewsky, A.D. and Benewolenskaja, S.V.: Arch. Exp. Zellf., 4: 64, 1927.
- 16) Morriane, T.G.: J. Exper. Med., 96: 107, 1952.
- 17) Meyer, K. and Rapport, M.M.: Science, 113: 596, 1951.
- 18) Feigin, I., Wolf, A. and Kabat, E.: Am. J. Path., 26: 647, 1950.
- 19) Gould, B.S. and Gold, N.I.: Arch. Path., 52: 413, 1951.
- 20) Goetsch, J.B., Reynolds, P.M. and Bunting, H.: Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 80: 71, 1952.
- 21) Kerppola, W.: Blood, 6: 454, 1951.
- 22) 宇都宮貞尚・松田孝雄: 医学と生物学, 26: 213, 1953.