

結核性肺空洞の菌と組織細胞化学

(第 I 章)

小林 周

国立愛知療養所 (所長 久野 馨)

指導 名古屋大学医学部病理学第一講座 宮川正澄教授

名古屋大学医学部内科学第一講座 日比野進教授

受付 昭和 32 年 3 月 27 日

(I) 緒 言

肺結核空洞が臨床的にも病理学的にも肺結核を研究対象とする場合重要な意義のあるのは転移源としての性格を主としておることであり、それは個体自身にとつて結核が進展増悪する上からも感染源としての公衆衛生上およびその他あらゆる立場の上からも問題にする所以である。病巣が一旦空洞化した場合ホルモンの関与、あるいは免疫生物学的な推移あるいは神経系等の全身的な影響を受けながら空洞において局所的にも菌と生体とが絶えず闘争を繰返す環境は空洞組織の特殊性である。この点についての型態学的な検索はすでに多くの学者によつて論及し尽されていてもはや加えるものはなかろう。しかし空洞の型態像に対して病理総論学的な解釈を下す上に菌出現との関連のもとに眺めてみるならばおのずからそこに型態学の具現された姿に対する経時的な動態の把握が容易になることは論を俟たないところである。この目的にそつて菌検出能力の非常に勝れたかつ同時的に組織像を観察しうる慈恵会医大矢崎芳夫教授式蛍光顕微鏡を使用し1951年来菌と組織反応との相関性を研究してきた。1952年宮川教授と著者は空洞壁結核菌の出現分布について空洞壁の化膿膜層、乾酪層、特殊肉芽織層、非特殊肉芽織と全層に渡つて出現する瀾蔓型(D型)と化膿膜層のみかまたは化膿膜層に著しく多く乾酪層で著明に減少し他層には認められない層状型(Z型)と各層に少しずつ散在する少菌型(W型)に大別することができることを明らかにした。その後多くの検索によつてD型、Z型、W型の菌出現様式は同一空洞において互に移行し合ういわゆる波状の消長を考えなければならなくなつた。特に菌の發育増殖する場としては体液の還流を受けかつ空気に触れうる局所的な特殊性を持つ化膿膜層が主点をなしているものと考えられる。この観点に立つて著者は空洞壁全層ならびに化膿膜層を構成する游出細胞について菌との関連における組織化学的研究を実施した。

(II) 研究対象

剖検空洞および外科的切除肺について切除直後空洞を

切開し(その際血液が流入しないように特に注意する)化膿膜と乾酪物を一部含めオブジェクトガラス上に塗抹した標本を使用する。一方残余の空洞は空洞壁組織およびその周辺肺組織を含めたものを切除し使用する。

(III) 研究方法

塗抹標本は1日室温にて乾燥せしめホルマリン蒸気にて固定する。この固定された標本について下記の組織化学を実施する。一方空洞組織は無水アルコールおよび冷アセトンにて48時間固定。その間液を2~3回取替える。次いでベンゼンまたはキシロールで透徹し53~56°Cのパラフィンにて包埋、薄切切片とする。この切片について組織化学を実施する。組織化学実施事項はまず組織切片については Auramin 菌染色による Z 型、W 型出現の分類下にそれぞれについて、1. アルカリ性グリセロホスファターゼ染色(以下 al. GP と略)、2. 酸性グリセロホスファターゼ染色(以下 ac. GP と略)、3. 組織等電点測定、4. 脂肪染色(中性脂肪、Sudan III法)を実施。

① al. GP 染色は基質としてグリセロリン酸ナトリウムを使用、量は0.25g、緩衝剤は Sørensen 氏液2.0cc、溜水3.0cc、0.75%塩化カルシウム水溶液5.0cc、5%塩化マグネシウム水溶液1.0ccの基質混合液で pH 9.3に調製、12~24時間浸漬、次いで溜水にて充分水洗し2.5%硝酸銀水溶液中に切片を入れ直射日光に10数分曝らす。溜水で水洗、3%チオ硫酸ソーダ水溶液に数分浸漬、水洗、マトキシリンで核染色、脱水、カルボールキシロール、バルサム封入。

② ac. GP は 2% グリセロリン酸ソーダ水溶液10cc、pH 5の1/5M醋酸塩緩衝液5cc 2%醋酸鉛水溶液10ccの基質混合液に37°Cで15~24時間浸漬し次いで溜水で水洗1~2%醋酸水で1分間前後洗滌、溜水で充分水洗、切片を1~2%黄色硫化アンモン液の中に2分間浸漬、流水で水洗、マトキシリンで核染色、脱水、カルボールキシロール、バルサム封入。

③ 組織等電点の測定

染色による等電点の測定で Pischinger 氏法を使用、

酸性染料としてクリスタルボンソー、塩基性染料としてメチレン青を使用。蒸溜水で0.005%メチレンブラウ水溶液を作りこれを50cc、1%稀釈のpH 2.2, 2.6, 3.0, 3.4, 3.8, 4.2, 4.6, 5.0, 5.4, 5.8, 6.2のMcIlvane氏液に混ざる。この溶液のうち8 μ の等しい厚さの組織切片を入れときどき振盪しながら約30分染色する。染色された切片は濾紙で水を取り次いで空気中で乾燥後キシロールで透徹、バルサム封入す。組織成分の染色された強さは標準色階表と比べて決定する。標準色階表はまず0.008%メチレンブラウ溶液(0.01% \times 0.8)20ccを作りその16ccを取り水4ccを加えて0.001% \times 0.8²のものをうる。次にこの16ccを取りまた水4ccを加えて0.001% \times 0.8³のものをうる。これを1列の同じ太さの試験管に入れてこの色を白紙に写して色階表を作り1, 2, 3と番号を附する。各空洞壁切片について各pH毎に染色の強さを記入し線を書く。酸性染料と塩基性染料の両方の線が交わる点のpH値を求める。しかし今回はメチレンブラウのみを使用線急降の中心のpH値の平均点を求めた。

④ 脂肪染色

Sudan IIIを使用する中性脂肪染色である。塗抹標本については、(1) アルカリ性GP, (2) 酸性GP, (3) ATP ase, (4) PAS染色法を実施。

以上の染色後に同一標本についてRhodamin-Auramin染色、ヘマトキシリンまたはギームザ染色を施し同一プレパラート上に細胞の型態と結核菌と酵素を同時に観察する重複染色方法を使用した。そのためにはまず酵素染色次いで菌染色次いで核染色の順序で行わねばならないと同時にお互いがほとんど影響を受けないような方法を選択しなければならない。

① al. GPについては混合基質溶液としてグリセロ磷酸ソーダ0.2g, Sørensen 緩衝液8cc, 溜水12cc, 0.75%塩化カルシウム液20cc, 5%塩化マグネシウム液4cc, 8.5%食塩水2.8ccのものを使用し予め37°Cに温めておき切片を投入し15時間浸漬する。次いでアルカリ性水で数回洗滌し最後に1回蒸溜水を通してアルカリ水をおとす。切片標本の場合は次ぎにKossa氏反応を利用したが後にRhodamin-Auramin染色して塩酸アルコールで分別するからこの反応では銀が塩化銀となつて除かれてしまうから不適當であり硫化鉛法を利用するところの不備な点を打開することができる。すなわち濾過した2%醋酸鉛液に30分浸漬(孵卵器内操作)十分水洗後2%黄色硫化アンモン液に5分間浸漬、後染色はHEまたはギームザを使用す。

② ac. GP

2%グリセロ磷酸ソーダ液20cc, 2%醋酸鉛20cc, Walepole 緩衝液10cc, 5%塩化マグネシウム1ccの割合に混合し生じた濁濁液を濾過し濾液を混合基質溶液としてpH 5に調製し37°C 15時間浸漬、次いで溜水で洗

滌、2%黄色硫化アンモン液に5分間浸漬する。

③ ATP ase

ATP 0.05g, グリシン20cc, 1%塩化カルシウム20cc, 5%塩化マグネシウム10cc, 溜水50cc, これを使用基質混合液としpHを9.3に調製する。37°C 15時間浸漬次いで硫化鉛法を使用する。

④ PAS染色, Lillie氏法を利用する。

以上の各染色後Rhodamin-Auramin染色し塩酸アルコールで分別する。この場合上記諸反応は影響を受けない。次いで後染色としてHEまたはギームザ染色を施行し矢崎式蛍光顕微鏡で菌を検索する。同時に本装置は暗視野ではなく半透明視野であるから菌の観察と同時に組織ないしは細胞の上記諸反応を大体認めることができる。これは本蛍光顕微鏡の特徴であることを強調したい。一方蛍光燈の光源を用意しておき組織や細胞をさらに確認するため反射鏡のみを動かし紫外線に代る蛍光燈光を入れ接眼フィルターをはずし検索する。かくして菌所見と組織細胞の諸反応を同一プレパラート上に表現観察しうるができるわけである。

(IV) 検索成績

1. 剖検空洞の化膿膜層の型態像

肺結核空洞壁において最も多く菌の出現を見るところとしての化膿膜の細胞構成を見ると変性または崩解細胞が多いが正常な型態としてとらえられるものは好中球と大単核細胞である。これらの細胞の游出百分率は菌出現の型別から眺めてみると次の結果になつている。

表 1

細胞別 型別	好中球 (%)	大単核細胞 (%)	その他 (%)	
D型	例1	54.1	20.3	25.6
	例2	48.2	16.1	35.5
Z型	例1	35.4	35.4	29.2
W型	例1	34.5	17.6	47.9
	例2	42.4	26.3	31.3
	例3	44.7	31.8	23.5

この表から分かるように好中球は検索細胞数の34.5%ないし51.4%を占めている。大単核細胞は16.1~35.4%をしめている。しかもD型、Z型、W型の間にはほとんど相違がない。すなわち菌出現の型別の種類を問わず大体好中球が多いということが分る。これらの細胞と結核菌とが如何なる関係において存在分布するかという細胞内に結核菌が含有されている場合あるいは細胞外すなわち媒質中に菌が存在するかである。しかも細胞内に含有される菌は少数の場合がありあるいは多菌の場合、特に叢状の増殖像を認めるものもある。媒質中においてもばらばらに単独の状態が存在するものとあるいは分枝状

の型態をとるものあるいは叢状の菌塊状存在を認めることがある。菌含有細胞の種類を型別に代表例を選んで計測してみた結果は次の通りである。

表 2

細胞数 型別	有菌細胞数	有菌細胞内訳	
		好中球	大単核細胞
D 型	106	93 (87.7%)	13 (12.3%)
Z 型	27	22 (81.5%)	5 (18.5%)
W 型	6	5 (83.3%)	1 (16.7%)

すなわち最も多く菌を含有する細胞として好中球が指摘される。この点に関しては型別による相違を認めない。好中球内の菌は健全な型態のものが多く変性崩解の像のものは少ない。しかも細胞内多菌群において叢状をなす場合においては細胞内増殖が考えられる。

2. 切除肺空洞の化膿膜層の型態像

外科的切除空洞の化膿層を形成する細胞は剖検材料と同様に好中球と大単核細胞であることに相違はない。しかしながら当該層に出現する菌の状態は剖検例に比較して著明に少ない。すなわち空洞壁各層に出現する型態もZ型とW型が主であつてD型はほとんど認めえない。しかも肉芽層における菌出現の著減は剖検空洞との顕著な相違である。

3. 剖検空洞および外科的切除空洞壁の脂肪染色(Sudan III染色)

D型, Z型, W型の各型別において Sudan III染色を実施した結果は次の表の如くである。

表 3

空洞壁層 型別	化膿層	乾酪層	境界	特殊肉芽層	非特殊肉芽層
D 型	微細顆粒状	微細	粗大塊状	⊕ ⊖	⊖
Z 型	微細顆粒状	微細	粗大塊状	⊕ ⊖	⊖
W 型	ほとんど認めない	微細	粗大塊状	⊕ ⊖	⊖

すなわち多菌群においては化膿膜層に微細顆粒状の中性脂肪滴を認めるが少菌群においてはほとんど認めえない。乾酪層はいずれの型別にも微細滴状を認める。しかし乾酪層と類上皮細胞およびラ氏巨細胞が混在する境界辺においては粗大な中性脂肪塊を各型別とも認め一部類上皮細胞間にも認められる。特殊肉芽層、深くまた非特殊肉芽層においては認め難い。結局中性脂肪の存在状態は剖検材料のD型、切除材料のZ型、W型別においても同様な原則性を示しており著明な差違を認めることはできない。

4. 切除肺空洞壁の al. GP および ac. GP 染色

切除空洞について菌出現のZ型, W型のものをそれぞれ5例を比較すると比較的多菌のZ型においては表4の如

く少菌のW型においては表5の如くである。Z型の場合の化膿膜游出細胞の陽性度はW型のものと比較すると低いことが分る。乾酪層においてもZ型の時はほとんど陰性であるがW型の場合には乾酪層のところどころ島嶼状に弱陽性を呈することがあるしあるいは比較的全般的に

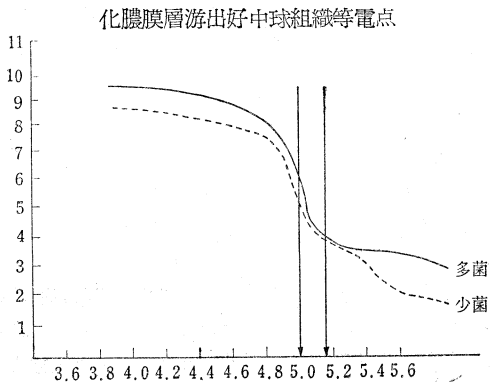
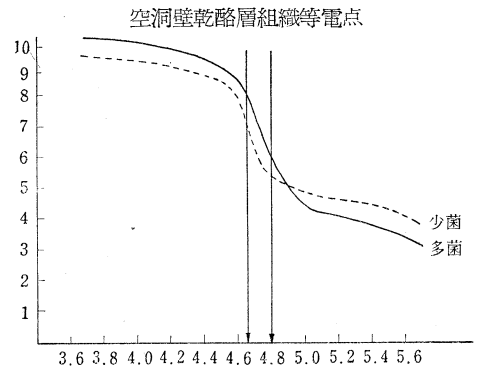
表 4

型別	空洞壁層	化膿膜游出細胞	乾酪層	類上皮細胞	ラ氏巨細胞	血管内皮細胞	肉芽層線維細胞
Z 型		⊕ ⊕	⊖	⊕ ⊕	⊕ ⊕	⊕ ⊕	⊕

表 5

型別	空洞壁層	化膿膜游出細胞	乾酪層	類上皮細胞	ラ氏巨細胞	血管内皮細胞	肉芽層線維細胞
W 型		⊕ ⊕ ⊕	⊕ ⊖	⊕ ⊕	⊕ ⊕	⊕ ⊕	⊕

瀰漫性弱陽性を呈することがある。特殊肉芽層においては両型別共類上皮細胞, ラ氏巨細胞の陽性度に著差はない。特殊肉芽層においては血管内皮細胞に強い陽性が認められ線維芽細胞, 線維細胞にも陽性所見を認めるが両型に著明な差異は見られない。したがつて空洞壁に認められる al. GP の分布でZ型とW型との差異は化膿膜と乾酪層に認められ他の層においては変化がないことを示している。これは菌の存在する層に見られる特殊性で菌



と細胞の酵素反応との関係を示すものと考えられる。

al. GP, ac. GPとは同じ分布を示し上記事項は両染色に全く同様に観察せられるところである。

5. 外科的切除空洞壁の組織等電点

図に見られるように、化膿膜游出細胞と乾酪化した物質との等電点の差異は明らかに生じているが、菌の多少による変化は認められない。化膿膜游出好中球についての細胞等電点も型態を明瞭にとりうる状態のものについては多菌少菌の別からでは著差を生じえないことを示している。わずかに変性に陥つている細胞についても0.2の差の範囲内であつて実験誤差の域に存しており乾酪化物ほどの著差を生じない段階に止まつている。

次ぎは外科的切除空洞からZ型, W型それぞれ10例について化膿膜游出細胞の塗抹標本による検索結果を述べる。

1. W型における菌含有好中球のal. GP陽性度百分率は表8の如くである。この表の如く強陽性の細胞で菌を含有しているものはほとんど認められない。最も多いのは⊕であるが陰性化しているものもかなり多い。陽性と陰性との比率は大略56%対44%で全体としてはわずかに陽性のものの方が多い。

表 8 W型における菌含有好中球のal. GP陽性度百分率

細胞	陽性度	卅	卅	+	-	計
好中球		0	25 (12.5%)	87 (43.5%)	88 (44%)	200

2. W型における菌含有好中球のac. GP陽性度百分率

表 9

細胞	陽性度	卅	卅	+	-	計
好中球		0	22 (11%)	92 (46%)	86 (43%)	200

これを見ると陽性度の比率, 陽性と陰性との比率も大略al. GPと似ており分布に差は認め難い。

3. W型における菌含有好中球のA T P ase陽性度百分率

表 10

細胞	陽性度	卅	卅	+	-	計
好中球		0	18 (9%)	97 (48.5%)	85 (42.5%)	200

この表に見る如く陽性細胞の比率は大略al. GP, ac. GPと同様の値を示しているが⊕がやや少なく⊕が増加している傾向がある。このことは本反応が前二者に比較して陽性顆粒がやや細かい性状を呈するところの相違の結果

かも知れない。以上のW型に対してZ型の場合を観察してみると次の如くである。

4. Z型における菌含有好中球のal. GP陽性度

表 11

細胞	陽性度	卅	卅	+	-	計
好中球	正常	0	4 (3.5%)	7 (6.1%)		11
	変形			8 (6.9%)	94 (83.5%)	102
						115

菌を含有していて正常型態をとりその上陽性を示すものが甚だ少なく表に見られるように大部分変性ないしは崩解し始めた像に接する。このことはW型に比較して著明な相異であり注目すべき点である。ac. GP, A T P aseも大體al. GPと同じ所見であり大差はないので表を省略する。

5. W型における菌含有大単核細胞のal. GPの陽性度百分率

表12に示すように好中球に比して絶対数が少ないと同時に陽性のものも少ない。

表 12

細胞	陽性度	卅	卅	+	-	計
大単核細胞			3 (3%)	10 (10%)	87 (87%)	100

6. Z型における菌含有大単核細胞のal. GPの陽性度百分率

この場合においても表13に示すように陽性のものは少ない。しかしW型に比して好中球と同様細胞の変性ないしは崩解の所見を認めるものが多い。

表 13

細胞	陽性度	卅	卅	+	-	計
大単核細胞	正常			2 (2%)		2
	変性は崩解			2 (2%)	96 (96%)	98
						100

大単核細胞のW型, Z型における菌含有の陽性数は好中球の場合の如く余り大差を見ない。ac. GP, A T P aseにおいてもal. GPと大略同じ成績を認める。しかしながら正常な型態の細胞で菌を含有することが少ない点に関しては好中球と全く同じ傾向を示している。以上の表はZ型, W型の塗抹標本上でそれぞれ10例について計測した総数または平均値であるがこれらは菌を含有している細胞に対しての観察で菌を含有していないものとの数的

比率はまずZ型においては好中球の場合は大体陰性3に対し陽性1の割合であった。W型になると2対4の割合になり陽性細胞の増加が目立つてくる。大単核細胞においてはZ型の場合大体、陰性5に対し陽性1の割合でW型においては比較的増加している所見を認めることができる。以上のように好中球や大単核細胞が菌を含有している状態において見られる各種ホスファターゼの陽性度は酵素活性の強弱を示すものとして考えられる。この反応の強弱を上記の卍, 卍, +, -の4段階に分けて所見を記載したのであるが顕微鏡下に見られる所見としては該酵素の顆粒の分布する広さおよび顆粒の大きさによつて主に判定したのである。一方細胞内に見られる菌の存在状態は単一の場合または分枝状に2匹の形をとるものあるいはさらに長くのびて3匹, 4匹になっているもの等が認められる。これら菌含有の状況と上記ホスファターゼ陽性度との関係を図示すると次の模型図のようになっている。

図1 菌含有好中球におけるal.GP, ac.GPの局在性

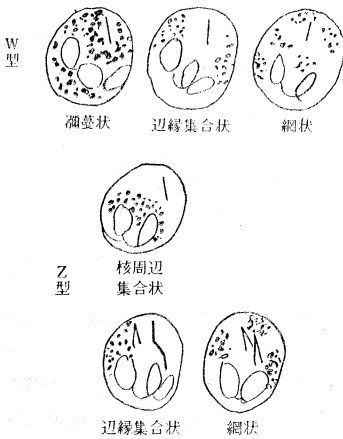


図2 菌含有好中球におけるATPaseの局在性

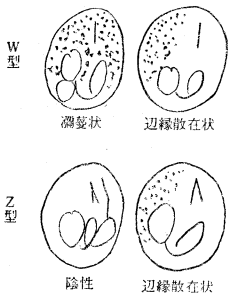


図3 菌含有大単核細胞におけるal.GP, ac.GPの局在性

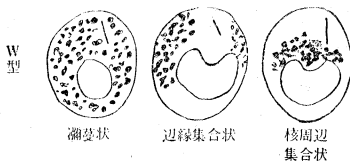
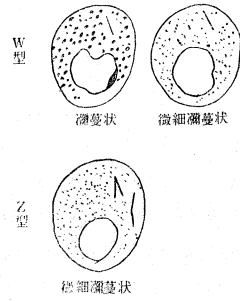


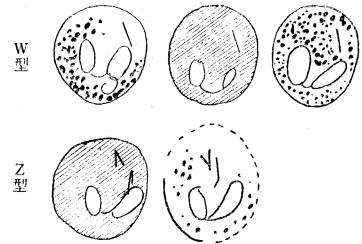
図4 菌含有大単核細胞におけるATPaseの局在性



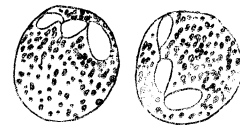
大単核細胞のうちには単球と組織球があるが上記諸反応の比較は両者の細胞学的診断がこれら反応の系列の中に行いえないので困難である。一口に大単核細胞と表現してもこの中には大型とやや比較的小さい小型単核細胞があり菌を含有することの多いのは主として大型のもので小型のものは比較的少ない。陽性度は小型のものの方が大型のものに比較して強い傾向が認められる。

7. 化膿層游出細胞のPAS染色について

(i) 菌含有好中球のPAS染色所見



菌を含有しない好中球



(ii) 菌含有大単核細胞のPAS染色はほとんど弱陽性で顆粒状の陽性は認め難い。

8. W型における菌含有好中球のPAS陽性度百分率

表 14

細胞	陽性度				計
	卍	卍	+	-	
好中球		40 (20%)	115 (57.5%)	45 (22.5%)	200

9. Z型における菌含有好中球のPAS陽性度百分率

ホスファターゼ染色に比して陽性度の強いものが多い傾向をW型, Z型にも認める。しかし分布の局在性は大方似ておりPAS陽性物質とホスファターゼとの関連性を窺うことができる。

表 15

細胞	陽性度	卅	廿	十	一	計
	好中球	正常		2	2	
	変形			4	92	96
						100

(V) 結 語

- ① 空洞壁化膿膜の細胞構成については菌の多寡によつて質的な著差を認めることができない。
- ② 空洞壁における中性脂肪分布は多菌群, 少菌群いずれにおいても乾酪層と非特殊肉芽層との境界に最も多く粗大顆粒状を呈している。
- ③ 空洞壁化膿膜層と乾酪層との組織等電点はそれぞれ pH 5.0~5.2と pH 4.7~4.9の移行値を示し菌の多寡による著差は認められない。
- ④ 空洞壁のホスファターゼは菌の多寡を問わず非特殊

肉芽層に最も著明である。乾酪層においては少菌の場合ときどき陽性を呈するが多菌の場合はほとんど陰性である。

⑤ 化膿膜の菌を含有しない好中球と単球の al. および ac.GP, ATP ase, PAS 陽性物質は多菌群においては陽性度の減少が著明で少菌群においては軽度である。

⑥ 菌を含有する好中球と単球の al. および ac.GP, ATP ase, PAS 陽性物質は多菌群, 少菌群共に減少する傾向がある。

⑦ 好中球, 単球の al. および ac.GP と PAS 陽性物質とは大体平行的に存在する。

⑧ 好中球, 単球共に菌を含有した場合原形質内の al. および ac.GP, ATP ase の分布は菌の存在カ所附近は少なくややはなれて存在する傾向が多かつ酵素顆粒の細化が認められる。

(総括, 考案, 結論, 文献は次章掲載)