#### 原 著

# 超薄切片による肺胞マクロファージ内結核菌の電顕的観察

### 金井興美•近藤瑩子•保田友義

国立予防衛生研究所細菌1部・結核部・技術部

受付 昭和 54 年 12 月 8 日

## THE DEMONSTRATION OF TUBERCLE BACILLI WITHIN ALVEOLAR MACROPHAGES IN ULTRA-THIN SECTIONS OF INFECTED MOUSE LUNGS BY ELECTRON MICROSCOPY

## Koomi KANAI\*, Eiko KONDO and Tomoyoshi YASUDA

(Received for publication December 8, 1979)

Mice were infected by iv infection with a virulent strain of *Mycobacterium bovis*, Ravenel R-KM strain, to prepare specimens for electron microscopical observation of their intracellular morphology. Observation was made with ultra-thin sections of the lungs at an advanced stage of infection. A typical picture of alveolar macrophage was obtained which was locating within the exudate-filled alveolar space and ingested several mycobacteria. The macrophage was sitting on the epithelial surface, adjacent to Type 1 and Type 2 epithelial cells, and extending actively pseudopods into the exudate. In some other occasions, the cytoplasm of infected macrophages was injured as evidenced by the marked swelling of their mitochondria. When the intracellular mycobacteria were morphologically intact, their cell wall layers, nuclear materials, electron-dense small granules, lipoidal inclusions and intracellular membrane structures were observed.

#### 緒 言

1954年, Brieger と Glauert<sup>10</sup>は,実験的感染マウス肺 病巣の超薄切片を用いて, *in vivo* の結核菌の形態をはじ めて電顕的に観察した。しかし,菌の検出は一般的方法 では極めて困難で,有毒株を多量接種した場合にのみ可 能であつた。また発表された写真が,菌の内部構造を知 るに不充分であつたことは,当時の技術の限界を示すも のであろう。その後,1964年, Merckx ら<sup>20</sup>も感染マウ ス肺病巣において,抗酸菌の超薄切片電顕像の観察を試 みた。この場合,宿主組織球とそれに取り込まれた菌と の相互作用の結果と推定されるオスミオフィリックなラ × ラ構造の発見が報告の主体で,肺の一般的構造の中に おける肺胞マクロファージと、その中の菌の生態につい ては、所見が得られていない。

この間,組織培養細胞における結核菌の観察は,Toda ら<sup>30</sup>,福士ら<sup>40</sup>,Armstrong と Hart<sup>50</sup>,Leake ら<sup>60</sup>によ つてなされ,そこでの条件における菌の超微細内部構造 については次第に知見がすすんできた。また実験的につ くられた肉芽腫内のマクロファージにおいての結核菌の 観察は,Dumont と Sheldon<sup>70</sup>によつて,そして菌に対 するライソゾームの反応が Nishi<sup>80</sup> によつて報告されて いる。にもかかわらず,結核感染の実験モデルとしてそ の使用がますます一般化しているマウスにおいて,感染 肺胞マクロファージの観察は依然として報告がない。私 たちはこれまでマウスを用いて結核感染の諸問題を研究

<sup>\*</sup> From the First Department of Bacteriology, National Institute of Health, 2-10-35, Kamiosaki, Shinagawa-ku, Tokyo 141 Japan.



Fig. 1. Pulmonary capillary and other components of the alveolar septum in normal mouse. ALV, alveolar space; CL, capillary lumen; PNL, polymorphonuclear leucocyte; RC, red blood cell; TC, thrombocyte; MC, blood mononuclear cell; FB, fibroblast; EC, endothelial cell; EP1, Type 1 epithelial cell; AM, alveolar macrophage; PC, ingestion of filamentous material by pseudopods.



Fig. 2. A mycobacteria-ingesting alveolar macrophage in the exudate-filled alveolar space of an infected mouse.

ALV, alveolar space; Exu, exudate; CL, capillary lumen; AM, alveolar macrophage; EP1, Type 1 epithelial cell; EP2, Type 2 epithelial cell; PNL, polymorphonuclear leucocyte; single arrow, myco-bacterial cell; double arrow, possible presence of hydrophobic substances (surfactant).



LI, lipoidal inclusion; N, nuclear material; MS, intracellular membrane structure; DG, electron-dense small granules; art, artefact; arrow, the phagosomal membrane very close to the mycobacterial surface.



Fig. 4. The injured cytoplasm of a mycobacteria-containing macrophage as evidenced by swelling (SW) of mitochondria.

art, artefact; arrow, cell wall layers

してきたが,今回形態学的な面を検討していたところ, 肺胞構造の中において感染マクロファージの像をとらえ ることができたので報告する。

#### 実験材料と方法

感染: Mycobacterium bovis (カナマイシン耐性 Ravenel 株)のソートン合成培地上 2 週発育より菌液を調製し, 体重 20g 前後の ddY 系マウスの雄50匹に,その 0.05 mg 菌量を静注した。これらのマウスは,別途計画され た化学療法剤による治療実験において,非治療対照群と して用意されたものであるが,感染後 157 日においてそ の一部を電顕標本作製のため利用した。この間,経時的 に肺感染菌数を定量培養によつて測定し,その消長を追 つたところ,感染10日以後はほとんど 10<sup>7</sup> 前後の菌数を 維持したことが証明された。

電顕標本作製: 0.1 M cacodylate バッファーにとかし た2.5% paraformaldehyde と 2% glutaraldehyde の混 合液<sup>9)</sup>を 1 ml 静注してマウスを殺した。 肺を摘出し, 微細な小片にカットし、37℃ 2時間,同液で前固定した。 次に,上記 cacodylate バッファーにとかした 1%冷オ スミウム酸で後固定をし、そのあと、acetate-veronal バ ッファー (pH 5.0) に 0.5%にとかした uranyl acetate で染色した。標本をエタノール で 段階的に 脱水 し, Epon 812 に包埋した。glutaraldehyde によつて標本内 結核菌は 30分以内に殺されることが知られているが<sup>50</sup>, これまでの操作は細菌実験室のフード内で実施された。

電顕観察: LKB ultratome 8800 を用いてつくつた超 薄切片を, uranyl acetate<sup>10</sup> と lead citrate<sup>11)</sup>で染色し, 日立 H-500 透過型電子顕微鏡を用いて, 加速電圧 75 kV の条件で観察した。

#### 観察と考察

観察した肺は、正常マウス肺と、感染157日の肺であ る。後者は多数の菌を含む肉芽壊死病巣と、比較的正常 な肺構造を維持した部分とが混在し、病変の強い部分で は、肺胞上皮細胞の増加と変化をみることもしばしばで あつた。本報告では比較的変化の少ない部位における肺 胞マクロファージを中心に述べ、他については機会をあ らためて報告する。

Fig. 1: 正常マウス肺で,左右の肺胞空間 (ALV) を区 切つて中央に alveolar septum があり,3つの毛細管内 腔 (CL) がみえる。その内腔に,多数の electron-dense の顆粒をもつた多形核白血球 (PNL),赤血球 (RC),血 小板 (TC),単核細胞 (MC) などがあり,血管内皮細胞 (EC)の核も1ヵ所でみえている。その他,Type 1の肺 胞上皮細胞 (EP1),線維芽細胞 (FB) と思われるもの, また左下端には結締織の部分が少しみえ,おそらくコラ ーゲン線維や弾力線維を示すものであろう。特に注目し たいのは、左下部における肺胞マクロファージ(AM) で あつて、肺胞表層の上にのつた状態で存在し、偽足をの ばして線維状の物体 (Type 2 の肺胞上皮細胞から放出 される lamellar inclusion に由来するものか)を取り込 んでいる (PC)<sup>12)</sup>。

Fig. 2: 感染マウスからの標本 である。ここでは、比 較的白くぬけてみえる部分が肺毛細血管腔(CL)で、血 球成分はあまりのこつていないが 左上方では内皮細胞 (EC)の核がみえる。中央部分と右下端に存在する 肺胞 (ALV) は、滲出液 (Exu) 充満のため電子密度が高 まり、Fig.1 のような空白像とは対照的である。中央の 肺胞の左部に Type 2 の上皮細胞(EP2) があり、特有な lamellar inclusion とよく発達したミトコンドリアを示 し、<br />
一方、<br />
右部にある<br />
Type 1の<br />
上皮細胞(EP1)にはそ れらの細胞小器官がないが、その細胞質は延長して肺胞 表層を形成している。この EP1 に接して左に肺胞マク ロファージ(AM) があり、滲出液中に複雑に偽足をのば し、その細胞質には取り込んだ7つの菌の断面(単矢印) がみえる。その上方には、滲出液中に浮かんだ形でもう 一つの肺胞マクロファージと、多形核白血球 (PNC)の 小断面がある。興味あることに、EP2のよくそろつた微 小絨毛の周辺は滲出液との間に空白にみえる部分をつく り(複矢印),また滲出液中にも白い円形像が散見され る。EP2 は肺の表面活性物質 (surfactant) の生産蓄積細 胞とみられており<sup>12)</sup>, それが疎水性のリン脂質 dipalmitoyl lecithin を主体とするだけにこの像との関連性が示 唆される。一方、EP1 や MP の細胞表層はよく滲出液 になじんでいるようにみえる。

Fig. 3: Fig. 2 における MP 内の菌の存在部位を拡大 したものである。核に近いところに横断面あるいは斜断 面の菌が数個みえる。あるものは円形の lipoidal inclusion(LI) を示し, また electron-dense の小顆粒 (DG), 染色体を示唆する線維状構造 (N),また独特な膜様構造 (MS) なども存在する。菌体周辺は電子線透過帯であり, 一般に食胞膜と菌体表層との中間帯とされるが, Fig. 3 の場合はむしろ artefact (art) による部分が大きいとみ られ,実際には食胞膜と菌体表層との近接した (矢印) いわゆる "tight phagosome" である可能性が強いとみら れる。

Fig.4: Fig.3 と異なり, 細胞質の空胞化, ミトコン ドリアの膨化の著明なマクロファージの部分であり,取 り込まれた菌の断面も存在する。artefact のない断面に おいては, 細胞壁の層が識別しうるところもある(矢印)。 ミトコンドリアの膨化 (SW) が細胞崩壊の二次的な結果 であるか, コードファクターのような菌体成分の直接作 用<sup>13)</sup>であるかは, この写真のみからはきめがたいが,内 部構造をさまざまな程度に失つて円形化したミトコンド リアが多い。

#### まとめ

結核菌を取り込んだ肺胞マクロファージを肺胞構造の 場において電顕レベルで捉え,細胞内感染の生態を観察 した。

#### 文 献

- Brieger, E.M. and Glauert, A.M.: Tubercle, 35: 80, 1954
- Merckx, J.J., Brown, A.L., Jr. and Karlson, U.G.: Am. Rev. Resp. Dis., 89: 485, 1964.
- 3) Toda, T. et al.: Proc. Japan Acad., 36: 372, 1960.
- 福士主計他:第16回日本電子顕微鏡学会記録,16: 52,1960.
- 5) Armstrong, J.A. and Hart, P.D.: J. Exp. Med.,

134: 713, 1971.

- Leake, E.S., Ockers, J.R. and Myrvik, Q.N.: J. Reticuloendothel. Soc., 22: 129, 1977.
- Dumont, A. and Sheldon, H.: Lab. Invest., 14: 2035, 1965.
- Nishi, K.: Acta Histochem. Cytochem., 11: 252, 1978.
- 9) Karnovsky, M.J.: J. Cell Biol., 27: 137a, 1965.
- Watson, M.L.: J. Biophys. Biochem. Cytol., 4: 405, 1958.
- Venable, J.H. and Coggeshall, R. A.: J. Cell Biol., 25: 407, 1965.
- 12) Nichols, B.A.: J. Exp. Med., 144: 906, 1976.
- Kato, M. and Fukushi, K.: Am. Rev. Resp. Dis., 100: 42, 1969.