

原 著

結核結節乾酪壞死巢内での抗酸菌の免疫組織化学的検討

大友 幸二・坂本 祥一・海野 剛
青木 俊明・福島 一雄
河端 美則・岩井 和郎

結核予防会結核研究所病理学研究科

河 又 國 士

結核予防会複十字病院検査科

中 島 由 槻

結核予防会複十字病院第一外科

受付 平成5年9月1日

IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDIES ON MYCOBACTERIA IN
TUBERCULOUS NECROTIZING GRANULOMAS

Koji OHTOMO*, Syoichi SAKAMOTO, Takeshi UMINO, Toshiaki AOKI,
Kazuo FUKUSHIMA, Yoshinori KAWABATA, Kazuo IWAI,
Kunio KAWAMATA and Yutsuki NAKAJIMA

(Received for publication September 1, 1993)

For the purpose to know the pathogenesis of caseous necrosis in tuberculous lesion, authors compared the presence and the number of mycobacteria in the pulmonary tubercles of various histological types. Forty pulmonary tubercles obtained from 16 patients (9 males, 7 females; mean age 51) were examined.

By Ziehl-Neelsen (ZN) method, acid-fast bacilli were detected in 40% of 5 proliferative, in 12.5% of 24 productive and none of 11 sclerotic granulomas. By immunohistological staining with anti-BCG antiserum, positive staining was observed in 60%, 87.5% and 91% of each type of granuloma, respectively.

Types of necrosis were classified by silver-staining as necrosis after exudative reactions (EN), necrosis after productive reactions (PN) and filled materials after softening and liquification of necrotic lesions (LN). EN was observed in 24 tubercles, and mycobacteria were stained in 8% of EN by ZN method and in 75% by immunohistological method. PN was observed in 21 tubercles, and mycobacteria were detected in none and 5% of such type of necrosis by respective method. LN was observed in 28 tubercles, and mycobacteria were detected in 11% and 71% of these lesions by respective method. So, positive ratio by

*From the Division of Pathology, the Research Institute of Tuberculosis, JATA, 3-1-24, Matsuyama, Kiyose, Tokyo 204 Japan.

immunochemical method was significantly higher in EN and LN than in PN. Further, mycobacteria were stained with anti-BCG antiserum as granules and the number of such granules were much more numerous in EN and LN than in PN ($p < 0.01$).

From these results, it was suggested that necrosis might occur by different mechanisms in exudative reactions and in productive reactions.

Key words : Lung tuberculosis, Caseous necrosis, Acid-fast bacilli staining, Immunohistochemistry

キーワード : 肺結核症, 乾酪壊死, 抗酸菌染色, 免疫組織化学

はじめに

結核症は組織学的に類上皮細胞肉芽腫（以下 ECG）と乾酪壊死を特徴としている¹⁾²⁾。両病変は通常同一病巣内に同時にみられるが、ECG のみの病巣もある。いずれも細胞性免疫が深く関与しているが、ECG は感染防御の立場では生体に有利な反応³⁾、乾酪壊死は生体に不利な遅延型過敏反応^{2)4)~6)}と考えられている。しかし乾酪壊死の成因やその生体防御における役割に関しては、必ずしも十分解明されていない。

本研究では乾酪壊死の成因に関連して壊死にいたる前のどのような病変に、どの程度の量の抗酸菌が存在したのかを知るため、通常の抗酸菌染色に並行して、抗 BCG 抗体を用いての免疫染色（以下 BCG 染色）を行って検討した。その際、壊死部位を壊死前の反応様式により分類して検討したところ、BCG 染色での陽性率は、壊死前の反応様式と関連しているとの結果を得たので報告する。

2. 対象と方法

対象 : 患者は 1990 年から 92 年の 3 年間に、結核予防会複十字病院ならびに東京健生病院で肺結核症として治療され、薬剤耐性などの理由での手術例（12 例）、剖検例（2 例）、並びに肺癌などの疑いで切除された未治療の肺結核症 2 例の計 16 症例。男 9 人 : 女 7 人、平均年齢は 51 歳 ± 12.5 歳である。これら患者の組織標本中洞化していない、各時期の乾酪壊死巣（結核結節）40 病巣（大きさは組織上 2 mm 位から 1 cm まで）を対象とした（個々の病巣の結核菌培養は行っていない。なおグロコット染色を行い乾酪壊死がクリプトコッカス感染症である可能性は否定してある）。

方法 : ホルマリン固定・パラフィン包埋薄切切片を使用してヘマトキシリン・エオシン染色（以下 HE）、鍍銀染色、チール・ネールゼン染色（以下 Z-N 染色）を実施した。免疫染色は一次抗体として抗 BCG 抗体 (DAKOPATTS) を用い、ABC-PO (DAKOPATT

S) 法で行った。陰性対照は一次抗体を除去した染色標本とし、陽性対照は ZN 染色陽性標本とした。

結核結節の時期と様式の分類 :

HE による結核結節の時期は岩崎¹⁾ などによるこれまでの定義を若干変更し、壊死を取り囲む肉芽の時期を繁殖性肉芽（類上皮細胞の繁殖している時期の肉芽）、増殖性肉芽（膠原線維が増殖している時期の肉芽）、硬化被膜（線維化が出来上がった時期の肉芽。うち壊死部に石灰化をみるものは石灰化病変）に分類した⁷⁾。

壊死病変の様式を、その鍍銀染色の所見に基づき以下のごとく分けた。1) 壊死内部に壊死前の正常な肺胞構造がみられるものを滲出性反応後の壊死 (E 壊死)、2) 壊死内部に新生された鍍銀線維や膠原線維がみられるものを増殖性反応後の壊死 (P 壊死)、および 3) 壊死内部に肺の構造の消失がみられ軟化融解があったと思われる壊死 (L 壊死) とした¹⁾⁸⁾。

ZN 染色と BCG 染色の判定は壊死内の 1-2 カ所に少数個陽性であれば +、3-5 カ所に陽性であれば ++、6 カ所以上または密に陽性であれば +++ と判定した。

統計的検討はカイ二乗検定で行った。

3. 結果

a. 結核結節の時期と乾酪壊死の様式

結核結節 40 病巣の時期は、繁殖性肉芽 5 病巣、増殖性肉芽 24 病巣、硬化被膜 11（うち石灰化病変 1）病巣であり、増殖性肉芽病変が多数を占めていた。鍍銀染色による乾酪壊死の様式の分類では、図 1 のように E 壊死のみ 4 病巣、P 壊死のみ 4 病巣、L 壊死のみは 5 病巣であった。また E 壊死 + P 壊死は 6 病巣で全例 E 壊死を取り囲み全周性に P 壊死がみられた。E 壊死 + L 壊死は 7 病巣で全例 E 壊死内部に L 壊死がみられた。P 壊死 + L 壊死は 11 病巣であり、いずれも P 壊死内に L 壊死がみられた。また E 壊死 + P 壊死 + L 壊死は 3 例にみられたが、いずれも一番内部が L 壊死で、それを囲んで E 壊死があり、さらに全周性に P 壊死で囲まれていた。1 個の乾酪壊死巣が複数の様式の壊死病変から形成されていた

のは27病巣67.5%と高率であった。

各様式の壊死病変を合計すると、E壊死が24カ所、P壊死が21カ所、L壊死が28カ所みられた。また鍍銀染色でE壊死、P壊死と判断した壊死部位のHE染色所見を再検討するとE壊死部位は核の染色性も消失した、好酸性無構造の壊死であり、P壊死部位は核片の存在する細胞破壊性(Cytoclastic)壊死であった(図2)。

b. 結核結節内の結核菌陽性率

BCG染色による所見は図3のように顆粒状に陽性所見を呈した。

40病巣中Z-N染色は5病巣(12.5%)に陽性、

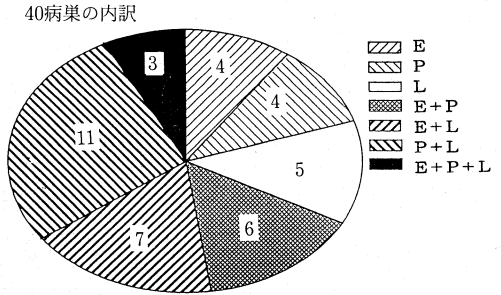


図1 鍍銀染色でみた乾酪壊死巣の様式

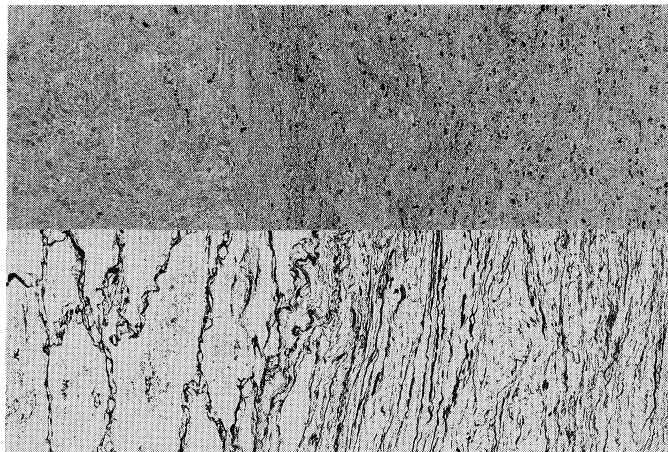


図2 同一病巣の壊死中心部の滲出性反応後壊死(左側)と周辺部の増殖性反応後壊死部(右側)

前者では核片がみられず、後者では多数の核片をみる。下方の鍍銀染色では滲出性壊死部の構造保持と増殖性反応後壊死部での嗜銀線維の新生をみる。

上 HE, 下 鍍銀 (いずれも対物レンズ 10倍)

BCG染色は35病巣(87.5%)に陽性であり、両染色間の陽性率の比較では1%以下の危険率で有意にBCG染色での陽性率が高かった。結核結節の時期別の両染色の結果を図4に示すが、Z-N染色での陽性率は繁殖性肉芽が40%、増殖性肉芽では12.5%と低下し、硬化被膜では0%であった。陽性病変では菌は乾酪壊死巣の中央部に染色される傾向があり、鍍銀染色との対比では陽性部位はE壊死やL壊死部位であった。一方BCG染色での陽性率は繁殖性肉芽で60%、増殖性肉芽は87.5%、硬化被膜は91%だった。

c. 乾酪壊死の様式と菌の染色性との関係

ZN染色陽性5病巣の内訳はE壊死部2病巣、L壊死部3病巣であった。一方、乾酪壊死の様式別のBCG染色陽性率とその程度を図5に示すが、1) E壊死では陰性は25%のみで、+は50%、#と##はそれぞれ12.5%

%, 2) P壊死では5%のみが+で他は陰性であった。3) L壊死では陰性は29%、+は39%、#は25%、また##は7%であった。BCG染色での陽性率は、P壊死とE壊死またはL壊死との間でそれぞれ1%以下の危険率で有意差がみられた。

4. 考 察

今回Z-N染色では繁殖性肉芽病変で40%の陽性率を得たが、増殖性肉芽では10%強に過ぎなかった。乾酪壊死巣内での菌数に関してはCanetti⁹⁾はSolid Caseum内では油浸100視野中の菌はほぼ2-5個、結節(結核性肉芽の意味)内では平均23個、硬化巣や石灰化病変中にはみられなかったと述べている。病変の時期毎の陽性率を出した川合ら¹⁰⁾は乾酪性肉芽腫27%、非石灰化被包乾酪巣と石灰化乾酪巣は0%と述べている。

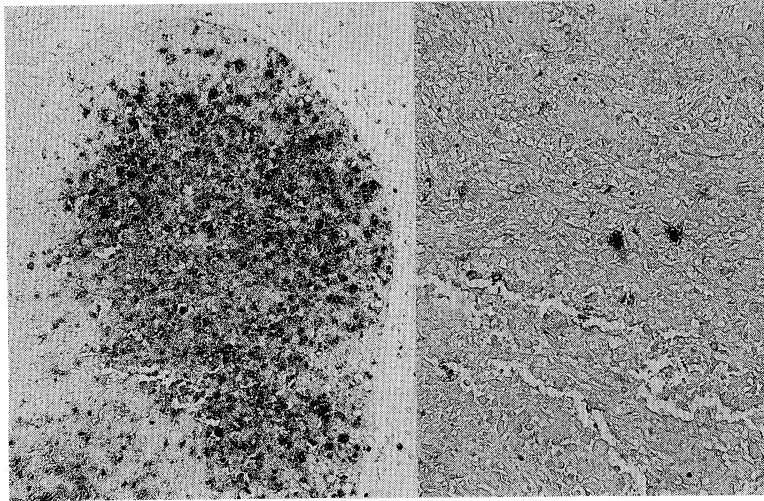


図3 結核結節内抗 BCG 抗体の免疫染色
左は#で数カ所に陽性所見をみる。右は##で多数の陽性像をみる。
対物 40倍。

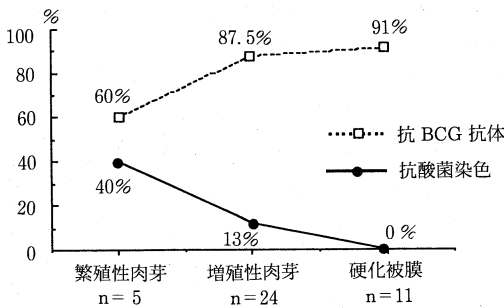


図4 病変の時期別陽性率

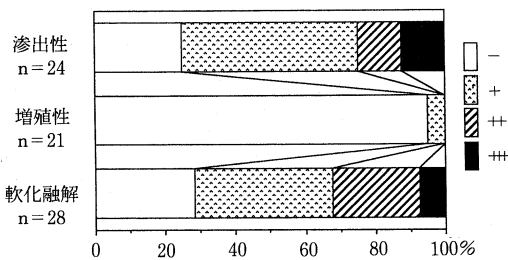


図5 乾酪壊死の様式と抗 BCG 抗体の染色性

筆者らの成績は結核症治療後の病変を対象としたが、未治療を対象とした川合らの成績とはほぼ同様であった。菌の陽性部位は壊死の中心部¹¹⁾と報告されているが、それはE壊死部やL壊死部に一致していた。

抗 BCG 抗体は BCG を破砕した菌体成分を抗原とし

て作成した多クローン性抗体であり、必ずしも結核菌に特異的ではなく、真菌や細菌でも一部陽性になることが報告されている¹²⁾¹³⁾。また染色形態も桿菌の形ではなく、顆粒状に染まってくることから、抗酸菌それ自身を染めているかの疑問も出る。筆者らは培養結核菌を使用して Z-N 染色と BCG 染色を実施したが、前者では桿状の菌として染まり、後者では顆粒状に染色された(図6)。抗 BCG 抗体を使用している免疫電顕でも、菌の表面に散在性の陽性像が報告されている¹⁰⁾。

今回対象とした病巣はほとんど空洞性肺結核症に伴って存在した。組織学的に抗酸菌症に特徴的所見を呈し、グロコット染色はすべて陰性でクリプトコッカスなどによる病変とは考え難い。それゆえ Z-N 染色陰性の病巣でも、BCG 染色で顆粒状の陽性所見を得れば組織学的所見と合わせ抗酸菌症の診断をより確かに出来、臨床病理学検査での利用価値は高いと思われる¹⁰⁾¹³⁾。

結核症での組織壊死は、渗出性反応に引き続き E壊死と、いったん ECG が形成された後でその部が二次的に乾酪壊死に陥る P壊死とに大別され、それは菌量、毒力と局所免疫反応の質的・量的差により左右されると思われる。

今回の成績では、一つの病巣が1種の壊死部を有することは少なく、その多く(67.5%)はむしろ2つ以上の性状の壊死から形成されていた。そのうち E+P壊死巣は全例が E壊死を取り囲む ECG が壊死に陥り、その外層に二次的に ECG が形成された「病巣の拡大的進展」¹⁴⁾に該当する所見であり、E壊死からの経気道性播種による P壊死病巣形成とその二次的な E壊死部と

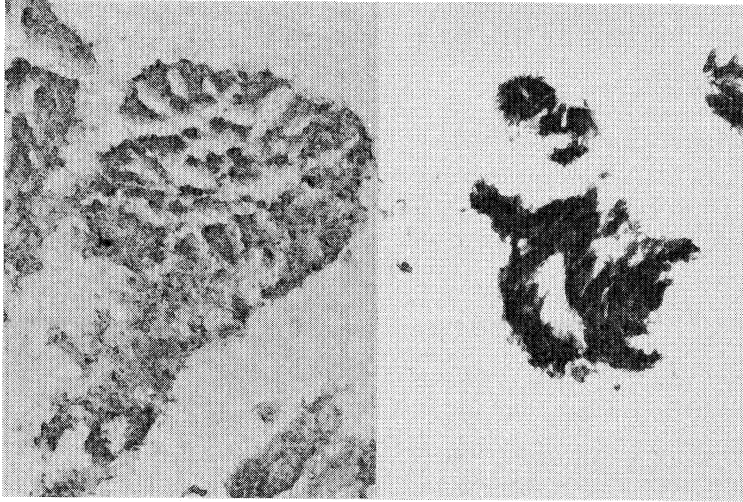


図6 培養結核菌塗抹標本のチール・ネールゼン染色と抗 BCG 抗体染色
 左) チール・ネールゼン染色では結核菌は束状増殖と桿菌の形態が明瞭。
 右) 抗 BCG 抗体染色では顆粒状に陽性所見がみられる。
 いずれも対物 40 倍。

の融合によるものではない。

なおL壊死は抗結核薬の使用の有無にかかわらず過半数の病巣にみられた。乾酪壊死物質の軟化融解とおそらくはその排除と再吸収とが、切れないし剖検された今回の症例では頻繁に起こり得たことを示している。

なおE壊死は当初水分に富み柔らかいが、時間の経過とともに水分は吸収され、そのような病巣内での抗酸菌は抗酸性を失い顆粒化するとされている¹⁵⁾¹⁶⁾。しかしながら菌体成分は病巣内に残存しその形態がどうであれ、抗 BCG 抗体との反応性を保持していると思われ、そのため BCG 染色では増殖性肉芽や硬化被膜になっても高率に陽性を示すと推測された。筆者らの成績は川合らのそれ¹⁰⁾を確認するものであった。

筆者らの BCG 染色の成績では、E壊死やL壊死部位で陽性率は高くかつ#や##も多かったが、P壊死部で陽性率は5%と低かった。一部のE壊死およびL壊死では陰性であったが、これは一切片での成績であり、連続切片を作り検索すれば陽性になる可能性が考えられた。なおL壊死で陽性率が高かったのは、軟化と空洞化に続く、菌の二次的増殖が起こっていたためと推測される⁹⁾¹⁵⁾。

抗結核剤治療の BCG 染色陽性率への影響については、治療群と未治療群間には特に差はなく、また石灰化病変や硬化被膜でも高率に陽性を示していた。抗酸菌の抗体との反応性は、治療に関係なく壊死部に長期間保持されていると思われる。

Canetti⁹⁾ や隈部¹⁵⁾ は滲出性病変の早期、類壊死などには大量の菌をみるが、乾酪化にいたると菌は急激に減

少するとしたが、それは通常の Z-N 染色での所見であり、乾酪巣内にも菌それ自体はなお多数存在しているであろう。

一方、P壊死部位は HE 染色では壊死内部に核破片を認め、Z-N 染色は陰性で、BCG 染色陽性率も5%と低かった。一度 ECG が形成され菌の増殖はみられないはずのこの部位がなぜ壊死に陥るのかについては以下の可能性が考えられた。1) ECG が形成された病巣部に生菌は存在しなかったが、菌体成分などに対する何らかの反応で組織は壊死に陥った、2) 増殖性病巣内部の乏血性壊死、3) ECG 形成にもかかわらず病巣部に菌の再増殖が起こり、そのため“細胞破壊性壊死性炎”が誘起され、菌の死滅のみでなく菌の形態または抗 BCG 抗体との反応性すら消失してしまった可能性である。

壊死の様式としてE壊死とP壊死があり、それはこれまで感染からの時期と反応様式の違いとして理解されてきたが、今回の観察でE壊死とは核融解を示す壊死であり、菌の形態は保持され、P壊死とは核の破片化を示す壊死であり、菌形態の変化を示す壊死であることを改めて指摘した。

E壊死もP壊死もいずれも免疫が関与した反応であり、壊死に陥る前の炎症反応を構成する細胞の種類とその活性化度などが、引き続いて起こる壊死の性状を支配すると推測される(未発表成績であるがE壊死部位にも、HLA-DR 陽性マクロファージやTリンパ球が存在することを確かめてある)。

今後、不十分なし未治療の結核腫例を対象として同

様の検討を行い、壊死になる直前の病変部への浸潤細胞や、放出されたサイトカインの種類などを免疫組織化学的にさらに検討し、壊死の形成過程をより明らかにしてゆきたい。

(この結果は第68回結核病学会で報告した。写真は当研究所大武岸次技師による。症例を使用させていただいた東京健生病院外科、木村文平先生に感謝します。また御校閲を頂いた当研究所名誉所長、岩崎龍郎先生に深謝します。)

文 献

- 1) 岩崎龍郎：結核病巣の様相とその成立。「結核の病理」, 岩崎龍郎編, 保健同人社, 東京, 1951, 6-21.
- 2) Rich AR : The factors responsible for the characteristics of tuberculous lesions and symptoms, in *The Pathogenesis of Tuberculosis*, Charles C. Thomas, Springfield. Second edition, 1951, 713-789.
- 3) Kindler V, Sappino AP, Grau GE, et al. : The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bacteriocidal granulomas during BCG infection. *Cell*. 1989 ; 56 : 731-740.
- 4) 山村雄一, 矢板 茂, 山口正民, 他 : 家兎肺臓における実験的結核性空洞の形成, その1. 結核アレルギーに関する実験的研究, 結核. 1951 ; 29 : 143-146.
- 5) De Vries RRP : An immunogenetic view of delayed typed hypersensitivity, *Tubercle*. 1991 ; 72 : 161-167.
- 6) Rook GAW, Foley NM, Meager A : What mediate the immunopathological component of the immune response to *Mycobacterium tuberculosis*? Can it be switched off? *Bulletin of IUATLD*, 1990 ; 65 : 23-26.
- 7) 河端美則, 岩井和郎 : 結核の病理. 「内科 MOOK, No.36, 結核」, 螺良英郎編, 金原出版, 東京, 1987, 18-26.
- 8) 岡 治道 : 結核性乾酪変性巣の格子状線維に就いて, *日本病理学会誌*. 1926 ; 15 : 292-294.
- 9) Canetti G : *The tubercle bacillus in the pulmonary tuberculosis lesions, in The tubercle bacillus in pulmonary lesions in man.* ed. by Canetti G. Springer, New York, 1955.
- 10) 川合健司, 堤 寛 : 酵素抗体法による抗酸菌同定の試み, *病理と臨床*. 1984 ; 2 : 862-867.
- 11) Ulbright T, Katzenstein A-L : Solitary necrotizing granulomas of the lung. *Am J Surg Pathol*. 1980 ; 4 : 13-28.
- 12) Harboe M, Mshana RN, Closs O, et al. : Cross-reactions between Mycobacteria, *Scand. J Immunol*. 1979 ; 9 : 115-124.
- 13) Wiley EL, Mulhollan TJ, Beck B, et al. : Polyclonal antibodies raised against *Bacillus Calmette-Guerin*, *Mycobacterium Dwalii* and *Mycobacterium Paratuberculosis* used to detect mycobacteria in tissue with the use of immunohistochemical techniques. *Am J Clin. Pathol.* 1990 ; 94 : 307-312.
- 14) 岩崎龍郎 : 肺結核症の種々相と自然経過. 「結核の自然史一個として群として一」, 岩崎龍郎編, 財団法人結核予防会, 東京, 1987, 26-36.
- 15) 隈部英雄 : 人体内における結核菌の生態—シューブに対する一考察, 隈部英雄編, 保健同人社, 東京, 1951, 17-74.
- 16) 岩井和郎 : 結核症の病理. 「結核病学, I. 基礎・臨床編」, 財団法人結核予防会, 3版, 岩井和郎編, 東京, 1990, 101-158.