

百日咳の感染病理

2. 百日咳菌の子宮内感染：標的細胞の検討

川崎医科大学 人体病理学教室Ⅱ

(指導：山下貢司教授)

広川 満 良

(昭和58年5月4日受付)

Pathology of Pertussis

II. Intrauterine Infection of Bordetella Pertussis: Study on Target Cells

Mitsuyoshi Hirokawa

Department of Human Pathology II
Kawasaki Medical School

(Accepted on May 4, 1983)

百日咳菌をマウスの子宮内に接種し、その運命および宿主の反応を観察した。菌は、子宮腔内で貪食されたり、子宮内膜の間質に侵入して、この部で貪食されるが、決して卵管内には侵入しなかった。肺や脳内感染の実験でみられた百日咳菌感染の特徴である繊毛上皮親和性や上皮下への非侵入性はみられなかった。百日咳感染の特徴的病態は、単に菌の能動的な性格のみによるものではなく、宿主と菌との相互関係の上に成立することを示していると考えられた。

In order to study the ciliotropism of Bordetella Pertussis, mice were infected by the mean of intrauterine inoculation and the microorganisms were identified in an appropriate time sequence with immunofluorescent technique. B. Pertussis were never transferred up to the oviduct. They were phagocytosed by macrophages within the uterine lumina, but also found in the interstitium of the subepithelial area. In contrast to the intranasal and intracerebral infection, intrauterine infection did not show any evidence of ciliated epitheliotropism and non-invasiveness. These findings indicate that the infectivity of B. Pertussis is not solely of their own activity but determined on the host-parasite relationship.

Key Word ①Bordetella Pertussis ②Intrauterine infection

はじめに

百日咳の感染実験としての接種経路については、①経鼻または経気道感染、②脳内接種、③皮内接種 (Gundel 反応)、④腹腔内注射の4つの方法がある。しかし、従来より一般に実

験的感染法として確立推奨されてきたのは、気道感染法と脳内感染法の両者である。前者は、自然の百日咳感染をモデルとしたものであり、後者は1947年に Kendrik らが導入した方法¹⁾で、現在ワクチンの検定、ワクチン菌株の選定、免疫に関する各種研究などに広く用いられ

ていることは言うまでもない。両方法は、一見まったく異なるように思われるが、宿主に対する百日咳菌の態度や、宿主の百日咳菌に対する組織反応には、おどろくべき類似性がみられる。すなわち百日咳菌は、細気管支の纖毛上皮細胞表面あるいは纖毛間に密着し、この部で増殖する。しかし上皮細胞内あるいは上皮細胞下組織への菌の侵入はみられない。脳内においても同様に、菌は纖毛を有する上皮細胞表面に附着して増殖し、脳実質内への侵入はみられない。このため、両者の感染は、菌対上皮細胞の面ではまったく類似の機序によると考えられ、すでに第1報²⁾にて詳細に述べた。

そこで、前回の気道感染および脳内感染実験の病態検討から強調した如く、百日咳菌の対組織の性質として、纖毛上皮細胞表面親和性と、上皮細胞内および上皮下組織への非侵入性の2つの特徴に焦点をあてることにした。果してこの百日咳菌の性質が、体の他の同様の上皮細胞に対して、どのような感染像を示すかをみることにした。すなわち纖毛上皮が標的細胞とみなしてよいか否かの検討である。気道と脳以外に纖毛上皮を有する臓器としては、卵管が本格的なものとして存在しているが、マウスの卵管は非常に細く、卵管内腔への菌の直接接種は不可能である。そのため卵管と直接交通のある子宮内に菌液を接種し、卵管への菌の侵入および感染状態を観察することにした。さらには、子宮内における菌の態度や子宮の反応にも注目することにした。

実験材料および方法

1. 百日咳菌: 自家性の Bordet-Gengou 培地で 35°C, 48 時間培養した 18-323 株 I 相菌を使用した。
2. 動物: 4~6 週令の C₃H/He 雌を用いた。
3. 免疫血清の作成 および 蛍光標識抗体の調製: 前回は行った実験 (第1報)²⁾と同様の標識抗体を使用した。
4. 感染接種方法: エーテル吸入麻酔下で開腹し、子宮体部を結索し、結索部より上部の両

側子宮腔内に、それぞれ菌液約 0.02 ml, 菌数にして約 10⁸ 個注入した。対照には、菌液のかわりに生理食塩水を使用した。

5. 観察方法: 注入後 1 時間, 3 時間, 6 時間, 12 時間, 1 日, 2 日, 3 日, 4 日, 5 日, 6 日, 1 週間, 2 週間, 3 週間, 4 週間, 5 週間目にそれぞれ 4 匹のマウス (対照では 2 匹のマウス) を屠殺して観察した。まず開腹し、左子宮および卵管は、蛍光抗体法のために、ドライアイス・アセトン中に冷置した n-ヘキサンで凍結し、クリオスタットを用い、4~5 μ に薄切りし、アセトンの前処理を行った後、4°C 下でオーバーナイト反応させ観察した。右子宮および卵管は、組織学的検索のために 10% ホルマリン固定、パラフィン包埋し、薄切後、H. E. 染色、PAS 染色など行ない観察した。

実験成績

1. 感染菌の運命

感染 1 時間後、菌は子宮腔内に free の状態として浮遊してみられるが、その一部は集合し、食細胞に貪食されている。3 時間をすぎると、貪食されずに浮遊している菌は少なく、子宮腔内にみられる菌の多くは、貪食された形で存在する (Fig. 1)。その蛍光には、強いものと弱いものの 2 種類があり、前者は後者に比べやや大型で、核に相当する非蛍光部が類円形であることより大食細胞と推定され、後者はやや

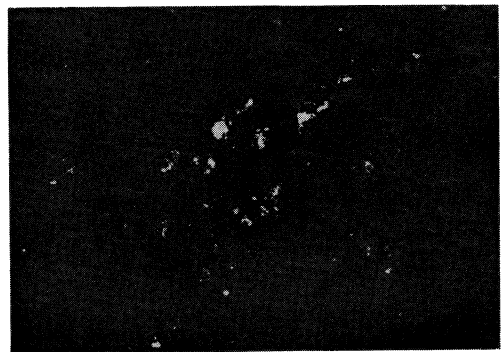


Fig. 1. Three hours after inoculation, bacteria are seen in the uterine lumen. A few of them are phagocytosed within macrophages.

(Fluorescent antibody. ×100)

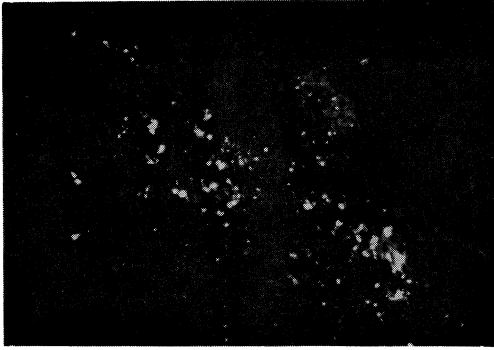


Fig. 2. After six hours, bacteria come to be found in the interstitium of subepithelial area.
(Fluorescent antibody. $\times 100$)

小型で、非蛍光部が不整であることより好中球に貪食されたものに相当すると思われる。また子宮内膜の上皮直下にも、freeの状態あるいは貪食された形でみられる (**Fig. 2**)。1日以後になると、本質的には、同様の所見を呈するものの、量的には、菌は非常に減少し、上皮直下の好中球内に、非常に弱い蛍光がみられるのみとなる。3日目以後では、菌はもちろん、好中球内にも蛍光はみられない。また、表層上皮や腺上皮の基底膜に沿って、非特異的な淡黄色の蛍光が目立つものもみられる。なお、卵管内にはいずれの時期にも、百日咳菌は認められていない。

2. 組織学的所見

イ) 卵 管

粘膜には、対照と同様に炎症反応はまったくみられない。漿膜側には、手術操作による腹腔の炎症の波及とみなされる好中球浸潤がわずかにみられたにすぎない。

ロ) 子 宮

感染1時間後より、上皮直下の間質を中心として、好中球を主体とする炎症細胞浸潤がみられる。炎症細胞反応は、3時間から24時間にかけてピークになり、この時期には、好中球は上皮下のみならず、子宮腔内、上皮細胞内、間質全体に及び、潰瘍形成もみられる (**Fig. 3, 4, 5**)。2日目以後は、炎症反応は乏しくなり、

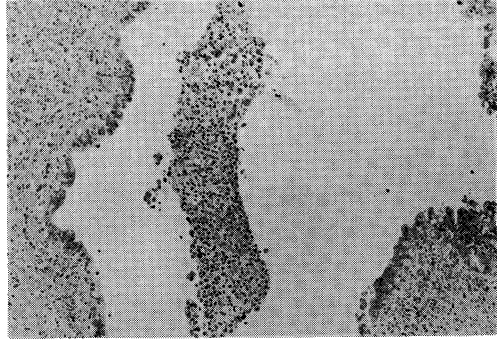


Fig. 3. After three hours, there are clusters of neutrophils and cell debris in the uterine lumen. (H. E. $\times 75$)

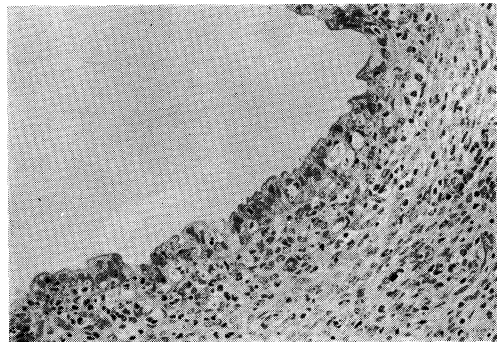


Fig. 4. After six hours, neutrophils may infiltrate into the epithelia. Note the cell debris in the cytoplasm of epithelia as well as in the basement membrane. (H. E. $\times 150$)

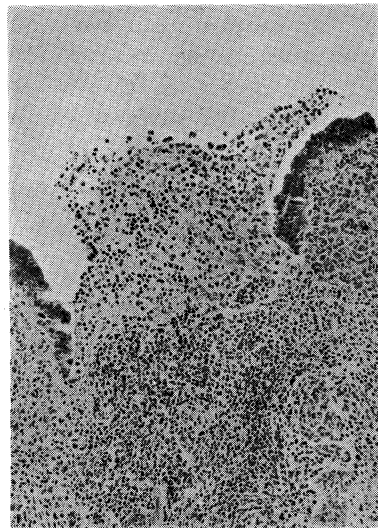


Fig. 5. After six hours, ulcer formation is focally present. (H. E. $\times 150$)

好中球浸潤の場合は、上皮直下の間質、上皮細胞内、あるいは子宮内腔に局所的にみられるのみで、潰瘍はもはやみられない。炎症細胞は、終始好中球が主体で、マウスによっては、好酸球を混在するものもみられる。また好中球浸潤に伴って、上皮細胞の胞体内および基底膜直上に核破砕物が多数存在し、なかには、その周囲が透明で、空胞内に存在するようにもみられる。PAS染色所見では、核破砕物が基底膜上に存在する場合は、基底膜の断裂を伴っていることが確認される (Fig. 6)。子宮内腔は、非常に



Fig. 6. The basement membrane is broken apart in places. (PAS x300)

拡張したものから、まったく拡張のないものまで種々で、1匹のマウスによっても、左右差の著しいものもあり、炎症反応の強い例に拡張が著しいという特徴はみられない。どちらかといえば、感染後数週間経過したマウスに拡張した例が多いように観察される。

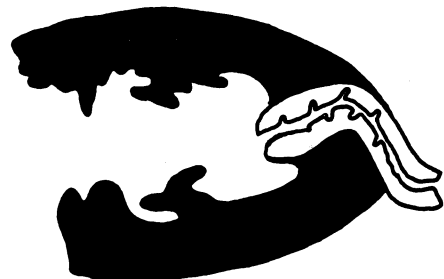
以上述べた子宮の病理組織像は、各グループのマウスすべてにおいて、同様の所見がみられたわけではなく、炎症反応が非常に強いものから、対照とまったく同様に変化のないものまで個体差が著しく、一定の規則性は明確にみられなかった。なお、実験中死亡したマウスはなく、すべて屠殺による検索である。

対照では、24時間以内では、一過性の軽い好中球、好酸球浸潤がみられ、数週間を経過したものでは、内腔の著明な拡張がみられた。また、どの時期に屠殺したマウスにおいても、基底膜直上に、核破砕物が散見されるマウスが数匹ずつみられ、月経期を示唆する所見と考えられる。

考 按

マウスの卵管は、約1.8 cm長のラセン状をした管で、卵巣周囲にある periovarian space と子宮内腔とを連結している³⁾。つまり解剖学的には、periovarian space、卵管内腔、子宮内腔は1つの腔として存在し、子宮頸部を結紮すれば、閉鎖腔となるわけである。このことより、子宮内腔に百日咳菌を接種すれば、感染菌数を一定にでき、菌は絨毛上皮に親和性を有するであろうことより、卵管内にも到達するものと考えた。しかし、実験結果は、全例において卵管内に菌を見出すことはできず、卵管の炎症反応も、すべての症例で粘膜の細胞浸潤はみられなかった。

子宮内腔から卵管内に菌の移動がみられなかった理由については、まず第1に utero-tubal junction の問題が考えられる。utero-tubal junction の状態は、動物によって異なるが、マウスの場合は Fig. 7 の如くなっており⁴⁾、接



■ uterus
□ isthmus

Fig. 7. Scheme of uterotubal junction in the mouse. (Modified from that of Hafez, E. S. E.⁴⁾)

種によって、あるいは炎症によって子宮内圧が上昇すれば、子宮筋層内の卵管は容易に圧迫されるものと推測される。第2には、卵管の数十にもおよぶ loop 構造が菌の侵入を防衛していると考えられる。第3の可能性としては、マウスの卵管は、ヒトと異なり、腹腔との交通はなく、periovarian sac とともに盲管腔を形成しているため、卵管の分泌液圧や periovarian sac 内液圧が菌液の侵入を阻止しているのかもしれない。さらに繊毛について考えてみれば、繊毛は、卵巣から子宮に向かって運動しており、通常の異物や細菌であれば、1つの blocking factor となりえる。

卵管における百日咳感染症が成立しないことに関して、この通常の繊毛運動が存在したか否かは非常に興味深い。というのは、肺や脳における百日咳感染の場合は、繊毛の運動を停止あるいは微弱にし、繊毛上皮細胞表面や繊毛間で発育増殖するからである^{5),6),7)}。上記の宿主側の解剖学的物理学的な卵管内侵入阻止機構が完璧であるなら、卵管内百日咳菌感染症が成立しないことの端的な説明となりえるが、子宮筋層内の卵管に対しても、完璧であったことは考え難く、逆に百日咳菌の繊毛上皮親和性を、卵管においては否定的と考えた方が妥当であろう。その原因については難解であり、上皮そのものの違いなのか、分泌液の性状の違いであるのか、今後の問題である。百日咳菌の繊毛上皮親和性には、臓器選択性があり、菌自体の能動的な特性であるというよりもむしろ、host-parasite relationship における性質といいかえられるべきものと考ええる。

次に子宮内における百日咳菌と宿主の組織反応について述べる。子宮内腔に注入された菌は、子宮内腔で食細胞に貪食されるものもあるが、上皮の間質に侵入して、この部で貪食されるものもみられる。組織反応としては、好中球を中心とした急性炎症反応が主体で、潰瘍形成もみられた。これらの反応は、3時間から24時間にかけてみられ、菌の長期生存、リンパ球浸潤はみられなかった。百日咳菌の子宮内腔での増殖がみられなかったことについては、内腔

内に存在する分泌液の性状も考慮せねばならないが、子宮内膜に繊毛上皮が存在しないことが、大いに関与していると思われる。ヒトやウサギでは、子宮内膜にも繊毛上皮が存在することが知られており^{8),9),10)}、ウサギによる感染実験では、異なる結果が得られるかもしれない。また、リンパ球浸潤がみられなかったことについては、早期に百日咳菌が消失するため、免疫系を賦活させたとしても、局所へのリンパ球浸潤が出現する時期には、必要性がないためと考えられる。あるいは、十分なリンパ球増多因子(LPF)を産生できなかったのかも知れない。また、脳内接種の場合も同様にリンパ球浸潤がみられなかったが²⁾、感染と場所のからみの関係が主要とも考えられる。

百日咳菌のもう1つの性質としての上皮下への非侵入性は、子宮においては実証されなかった。肺の細気管支にも、繊毛を有さない上皮が存在することより、単に上皮が繊毛を有するか否かの差とは考え難い。そこで子宮の臓器特異性を考えてみると、月経周期が存在することがあげられる。月経期には、ヒトと異なり粘膜の脱落はないが、基底膜直上への好中球浸潤や、核破壊物がみられる。百日咳菌を感染せしめた時も、同様の変化というよりもむしろ、より顕著にこの現象がみられ、透過性の亢進した基底膜を中心に炎症反応が起っているようにもとれる。さらには、Fig 6の如く基底膜の断裂のみられることもある。肺や脳と異なる点をあげるとすればこの点であろう。つまり、子宮の基底膜には、他臓器と異なる特殊性があるのかもしれない。さらには、酸素、pH、ホルモンなどの影響も関与しているかもしれない。いいかえれば、肺や脳における上皮下への非侵入性という百日咳感染症の特有な病態もまた、菌自体の性質のみではなく、菌と宿主の感染器官の両者の関係の上に成立していることを示唆するものと考ええる。

稿を終るに臨み、終始御指導、御校閲を賜った恩師山下貢司教授に深謝致します。また、百日咳菌の分譲と御助言を下さいました武田薬品工業、医薬営業本部免疫製剤部松山繁夫部長、ならびに実験の御協力をいただいた山成憲子女史に深く感謝致します。

文 献

- 1) Kendrik, P.L., Eldering, G., Dixon, M. K. and Misner, J.: Mouse protection tests in the study of pertussis vaccine. *Am. J. publ. Health.* 37 : 803—810, 1947
- 2) 広川満良: 百日咳の感染病理 1. 宿主における菌の運命と病理学的反応について. *川崎医学会誌* 8 : 108—117, 1982
- 3) Hummel, K. P., Richardson, F. L. and Fekete, E.: *Anatomy. In Biology of the Laboratory Mouse* by Green, E. L. 2nd. ed. New York, McGraw-Hill Book Company. 1966. pp. 299
- 4) Hafez, E. S. E.: *Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory Animals.* Philadelphia, Lea & Febiger. 1970, pp. 90
- 5) Matsuyama, T.: Resistance of *Bordetella pertussis* phase I to mucociliary clearance by rabbit tracheal mucous membrane. *J. infec. Dis.* 136 : 609—616, 1977
- 6) Dolby, J. M., Thow, D. C. W. and Standfast, A. F. B.: The intranasal infection of mice with *Bordetella pertussis*. *J. Hyg. Camb.* 59 : 191—204. 1961
- 7) 春日忠善: 百日咳の免疫. *慶応医学* 47 : 607—627, 1969
- 8) Schueller, E. F.: Ciliated epithelia of the Human Uterine Mucosa. *Obstet. Gynec.* 31 : 215—223, 1968
- 9) Ferenczy, A. and Richart, R. M.: Scanning and Transmission Electron Microscopy of the Human Endometrial Surface Epithelium. *J. Clin. Endocrinol. Metabolism* 36 : 999—1008, 1973
- 10) Meyer, J. M.: Recherches sur l'ultrastructure de la muqueuse utérine de la Lapine. *Arch. Anat. Histol. Embryol.* 53 : 1—40, 1970