

電顕的検索が有用であったウイルス肝炎 (HBV, nonAnonB型)の2症例

検査部病理 倉 沢 百 合
八 木 弥 八
大 塚 証 一
黒 山 祥 文
藤田学園保健衛生大学医学部病理 笠 原 正 男
田 代 和 弘

藤田学園保健衛生大学医学部病理

I. 緒 言

ウイルス肝炎は、経口感染経路を示すA型肝炎ウイルス(以下HAV)、輸血・性交・採血等の感染によるB型肝炎ウイルス(以下HBV)、及び非A非B型肝炎ウイルス(以下non A non B)によって引き起こされる。HBVはBlumberg(1965)らによるAustralia antigenの発見後、免疫血清学的検査法が急速な進歩をなし、現在その定性・定量は広く一般に行われている。

HBVは直径42 nmの二重構造を有するDane粒子から成り、その内部はnucleocapsid即ち28 nmのcore粒子とそれを二重膜構造で被覆しているsurface coat(envelope)から構成されている。coreにはcore抗原(以下HBcAg)と内部に低分子蛋白のe抗原(以下HBeAg)が存在し、surface coatはsurface抗原(以下HBsAg)として存在する。このうち、HBcAg及びHBeAgは核に、HBsAgは細胞質内に存在するとされている。即ち、核内で複製されたcore粒子は細胞質内に出て、小胞体内で生成・貯蔵されているenvelopeに囲まれて、完全なウイルスとして放出される。一方、過剰生成されたenvelopeはcore粒子を持たないまま直径22 nmの球形、管状形として存在する。

HAVは直径27 nmの球形粒子から成り、RNAウイルスとされ、主に感染肝細胞質の小胞内に存在し、核内にはみられない。

non A non B型ウイルスについては現在不明な点が多いとされているが、直径20~27 nmの粒子が核内に存在する場合や管状構造物及びmicrotubular aggregate等が細胞質内に存在する場合があるといわれている。

以上、概略について述べたが、今回我々は剖検材料の肝組織標本より電顕的検索にて肝炎ウイルスlike particlesを認め、さらに光顕的観察及び免疫組織化学法からもHBVを証明した症例と、non Anon B型ウイルスを示唆し得た症例を経験したので、特に電顕的観察結果を中心に光顕的並びに免疫組織化学的検索等も合わせてそれらの形態学的知見について報告する。

II. 材料並びに方法

I) 電顕材料: 10% formalin 固定された剖検材料の肝組織を1 mm³大に分割し、0.2 MのPBS pH 7.2にて約2時間洗浄・脱 formalin 処理を行い、2% glutaraldehyde・4% paraformaldehyde 溶液4°Cにて6時間前固定、さらに10% sucrose、20% sucrose 溶液に各々2時間浸透・洗浄を行い、1% osmic tetraoxide 溶液で1時間後固定を行った。脱水操作は、ethylalcohol 50%、70%、80%、90%、95%及び無水 alcohol を使用して各々10分間ずつ浸透・脱水を行い、propylene oxideにて置換後、propylene oxide・epon812等量混合液にて3時間浸透、epon812にて37°C、45°Cに12時間、60°Cに24時間重合処理を行った。

薄切は、Reichert-Jung社 ultracutにて超薄切片を作製、染色は0.1%酢酸ウラニウム・0.01%硝酸鉛の二重染色を行った。

観察は、日本電子顕微鏡(JEM100-SX)にて観察した。

II) 光顕材料: 10% formalin 固定材料の肝組織を約3 cm大に切り出しし、約2時間流水水洗後、通常の methylalcoholによる脱水、paraffin 包埋及び薄切を施行した。

一般的染色法は、H・E染色、masson trichrome 染色を用い、組織化学染色には orcein 法、victoria blue 染色を使用した。

免疫組織化学染色では PAP 法による酵素抗体法を用い、一次抗体は MBL 社の HBs、HBc 抗体 (polyclonal antibody) 法を使用した。

III. 観察方法

I) 電顕的観察：低倍率 3,000、5,000、8,000 倍 (何れも撮影倍率) では、個々の細胞形態像即ち、細胞質、核の腫脹、粗面小胞体、mitochondria の変性所見、異常な封入体の出現の有無等を観察し、高倍率 20,000、40,000 倍では、ウイルス like particles の存在部位及びウイルス粒子の大きさと形態像を検索した。

II) 光顕的観察：H・E染色、masson trichrome 染色法では、肝炎ウイルスの一般的組織学的形態(肝実質障害、炎症反応性)等について、orcein、victoria blue の組織化学染色では、HBV による胞体内及び核内封入像の染色性を検索した。

III) 免疫組織化学(PAP法)：HBV の細胞質、核内における抗原局在性の証明等について検索を行った。

IV. 症 例

「症例1」 56歳。男性。臨床診断：肝硬変症及び肝不全。

昭和63年頃より HBs、HBc 陽性の肝硬変症にて治療されていたが、平成元年1月より下血を来し、その後 DIC を伴い、肝不全となり他界された。剖検診断は肝硬変乙型であった。検査成績、表1)参照。

電顕的所見：低倍率では、肝細胞周囲は結合織 (collagen fiber) が増生し、細胞辺縁が不規則性を呈していた。胞体内小器官や核 chromatin 構造は formalin 固定によりその繊細な構造は変性を来していたが、小胞体内の一部及び核内にウイルス様の微小粒子が多く観察された。

高倍率では、核内特に heterochromatin 内に多数の円形粒子が集合性で認められ、その大きさは約 20~30 nm と比較的均一性を示していた。一方、胞体内には小胞体を中心に多数のウイルス like particles を認め、40~60 nm の微細顆粒状を呈する粒子から成り立っていた。以上のようにその大きさから、核内粒子は core 粒子に、胞体内粒子群は Dane 粒子形に相当するものと考えられた。図1、2、3)

表1 入院時検査所見

RBC	344×10 ⁴	Na ⁺	135.1mEq/l
WBC	3400	K ⁺	4.2mEq/l
Hb	8.3g/dl	Cl	99.4mEq/l
Ht	25.4%		
Plt	16.3×10 ⁴		
TP	7.8g/dl		
ALB	2.3g/dl		
A/G	0.42	HA 抗体	99%
GOT	34u/l	HBsAg	51%
GPT	18u/l	HBsAb	2.4%
LDH	456u/l	HBeAg	6.9%
ALP	379u/l	HBeAb	22%
LAP	72u/l	HBcAg	100%
γGTP	24u/l		
cho-E	1414u/l		

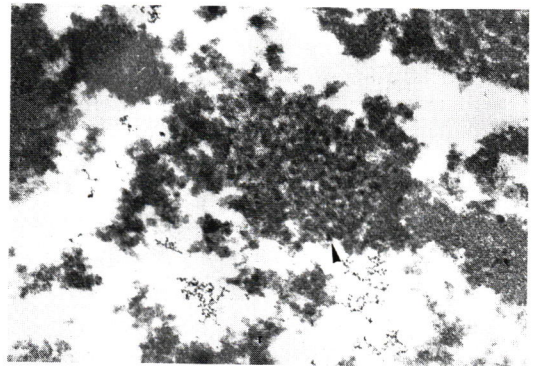


図1 電顕像、核内小型円形粒子 (45,000倍)

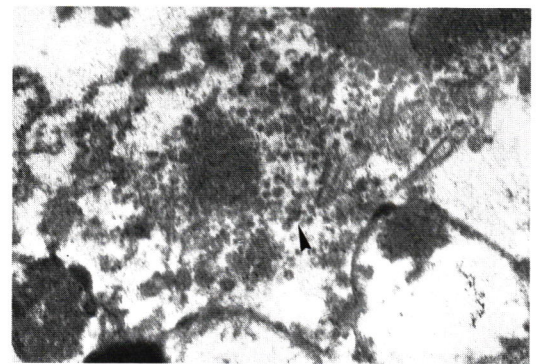


図2 小胞体内粒子 (40,000倍)

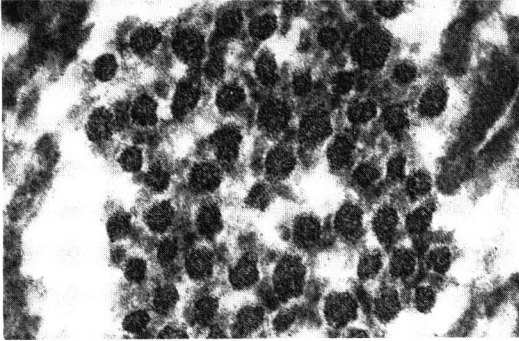


図3 胞体内粒子 (Dane 粒子様構造)
(100,000倍)

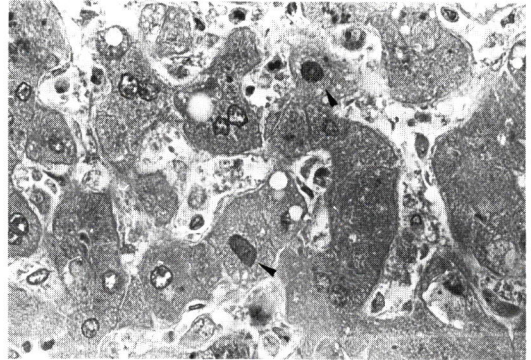


図7 HBc (PAP 法) 一部核内陽性を示す
(400倍)

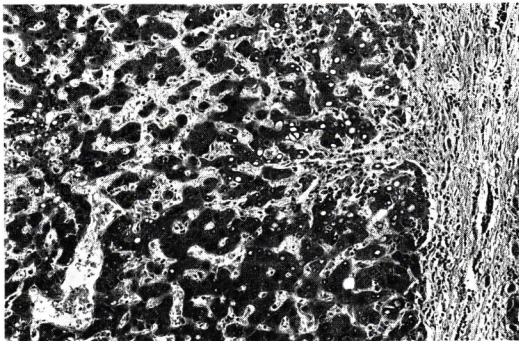


図4 偽小葉構造を伴った肝小葉 H.E 染色
(100倍)

光顕的所見：肝小葉周囲 glisson は結合織で増生され、偽小葉構造から成る通常の肝硬変の組織像を呈していた。個々の胞体はやや浮腫状から一部は淡い泡沫状又はスリガラス状を示し、核はスリガラス状や空胞化等も散見された。図4) orcein、victria blue 染色では、胞体内にび慢性から辺在性に陽性所見が得られた。図5) さらに酵素抗体法を用いると、HBs 抗体法では、所々の胞体内にび慢性を呈する強い陽性所見として認められ、HBc 抗体ではごく一部の核内、即ちスリガラス状を呈した核に一致して陽性所見を呈した。図6、7)

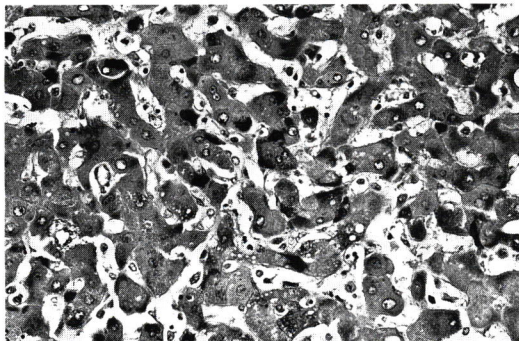


図5 orcein 染色 (黒染部位陽性) (200倍)

以上の各所見から、本症例は慢性活動性肝炎を伴い、肝硬変に移行した症例と考えられた。

「症例2」 57歳。男性。臨床診断：胃癌。

臨床診断にて胃全摘術を施行されたが、肝転移を来し、次第に腹水貯留、食欲不振となり、さらに全身悪化の為約4ヶ月目に他界された。尚、剖検後の組織診断は胃原発性内分泌細胞癌であった。本症例は carcinoid 様の増殖を伴い、肝、脾周囲、副腎及び右心房に転移を来していたが、carcinoid syndrome は認められなかった。検査成績、表2)参照。

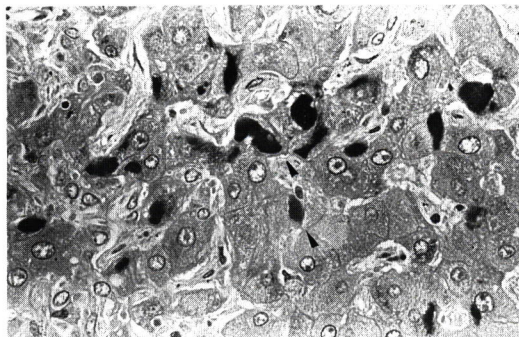


図6 PAP 法 HBs 陽性所見 (200倍)

電顕照所見：本症例は肝転移を呈した腫瘍細胞の超微形態像を把握する目的にて検索を試みたが、腫瘍巣とは別に肝細胞、特に核内にウイルス like particles を偶然認められた症例である。低倍率では mitochondria の腫脹と核の軽度腫大傾向が観察された。核内には顆粒状を呈するウイルス like particles の集簇がみられ、さらに高倍率で観察すると、約 20 nm の均一性で比較的密な粒子から成っていた。胞体内での粒子の存在、microtubular aggregate 及び管状構造物等は認められなかった。図8、9)

表 2 入院時検査所見

RBC	422×10 ⁴	BUN	15.5mg/dl
WBC	11500	Cre	0.9mg/dl
Hb	12.3g/dl	UA	4.2mg/dl
Ht	37.9%	Na ⁺	135.1mEq/l
Plt	30.0×10 ⁴	K ⁺	4.2mEq/l
TP	7.0g/dl	Cl	99.4mEq/l
ALB	4.2g/dl		
TB	1.0mg/dl		
DB	0.6mg/dl		
GOT	69u/l	ガストリン	52pg/ml
GPT	74u/l	ガストリン	40pg/ml
LDH	467u/l	アドレナリン	0.09mg/dl
ALP	1453u/l	ノルアドレナリン	0.71mg/dl
LAP	233u/l	ドーパミン	2.2mg/dl
γGTP	464u/l	グルカゴン	100pg/ml
cho-E	5750u/l	ヒスタミン	12.1ug/ml
T-cho	364mg/dl	セクレチン	87pg/ml
E-cho	257mg/dl	アルドステロン	39mg/dl
FBS	141mg/dl	レニン活性	7.5ng/ml/hr

光顕的所見：腫瘍巣と明らかに隔離した肝組織像は、中心静脈周囲に壊死を伴う所謂小葉中心型肝細胞壊死を認め、その中にリンパ球細胞の浸潤と一部には線維性結合組織の増生がみられる。図 10) 又、核は一部に空胞化やスリガラス状構造を呈した細胞も認められた。これらの観察からウイルス肝炎を考慮し、orcein、victria blue 染色並びに酵素抗体法 HBs、HBc を用いて HBV の検索を試みたが、明らかな陽性所見は得られなかった。図 11)

以上の観察結果から推測すると、電顕的には粒子の存在部位、形及び大きさから non A non B 型ウイルスと示唆され、光顕的組織所見から亜急性肝炎と考えたい。表 3)

表 3 HBV. non A non B 型ウイルスの比較

	EM		L. M			
	核内粒子	細胞質内粒子	オルセイン染色	ビクトリア青染色	抗素抗体法	
					HBsAg	HBcAg
症例 1	+	+	+	+	+	+
症例 2	+	-	-	-	-	-

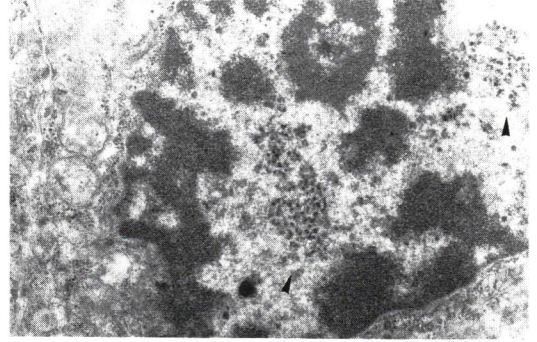


図 8 核内に小型粒子の集簇がみられる (20,000倍)

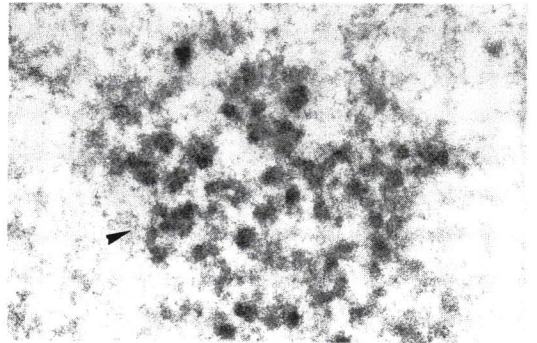


図 9 粒子は比較的密な顆粒状で円型を呈している (80,000倍)

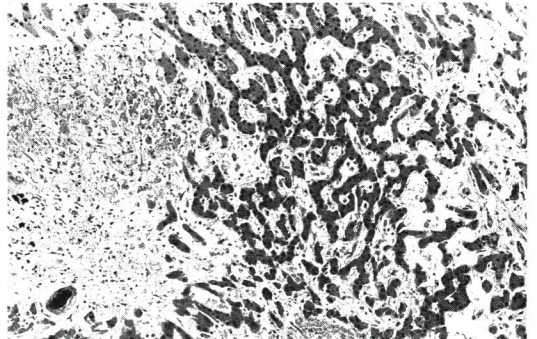


図 10 小葉中心性に壊死・炎症像を呈している (100倍)

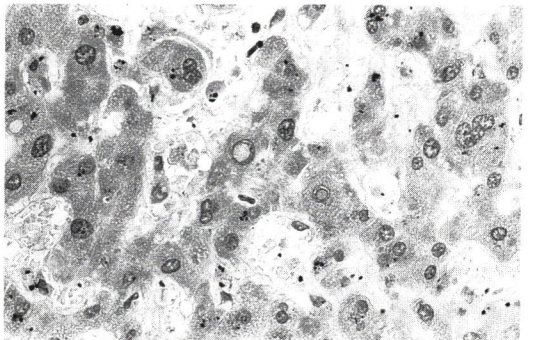


図 11 HBs (PAD 法) 核、細胞質共陽性は認められない (400倍)

V. 考 察

ウイルス肝炎はウイルスの種類に関係なく臨床的に、病変の強さ、発病後の経過、黄疸等により、急性ウイルス肝炎と慢性ウイルス肝炎に分けられている。このうち急性肝炎は、肝全体がび慢性に壊死を来すが、やがて線維化により再生を生じ回復に至る場合や、逆に肝実質の壊死が急速に進展し再生能力が生じないため急性肝炎を来す場合、又、数ヶ月以内に肝不全を生じる亜急性肝炎に変じたりする場合がある。又、慢性ウイルス肝炎は、肝細胞内からウイルスが十分に排除されないまま慢性的に増殖を示し、壊死や炎症反応が数ヶ月から後半に渡り持続しているもので、これには慢性活動性ウイルス肝炎と持続性ウイルス肝炎に分けられる。このうち慢性活動性ウイルス肝炎は肝硬変に移行する事が多いとされている。

組織学的所見における慢性活動性肝炎は壊死、炎症反応や再生後、肝細胞の腫大傾向及び脂肪変性が見られ、中でもB型肝炎にはスリガラス細胞等もみられる。又、超微形態学的には mitochondria の不規則な構造や特に粗面小胞体の膨化傾向は慢性活動性肝炎の特徴とされている。

症例1)では光顕的観察に文献的報告とほぼ一致した結果を得られたが、超微形態的には formalin 固定材料による影響から小器官の特徴は得られなかった。尚、HBV に関しては、文献的にもほぼ一致した結果が得られた。1)、3)、5)

一方、non A non B型ウイルスに関しては、現在解明されていない点も多く、動物実験(チンパンジー)を使用した肝細胞からは、超微形態的に微細形態的变化や管状物構造、microtubular aggregate などと呼ばれる微細構造物の報告がある。しかし症

例2)に関しては、核内に文献とほぼ一致する粒子の形態像や大きさをもつウイルス like particles を認めた他、特徴的な構造物は認められなかった。4)、6)

今後さらに症例を重ね、電顕的にも光顕的にも検討したいと考える。

VI. 結 語

1) B型肝炎ウイルスは25~30 nmの円形粒子が核内に多くみられ、core粒子に相当した。細胞質内の小胞内には40~60 nmの比較的大きな円形粒子が集合して認められ、Dane粒子に相当していた。免疫学的にHBs強陽性、HBcは一部に陽性所見を呈した。

2) non A non B型を示唆された症例では、核内に20 nm大の密な顆粒状を示した円形粒子が多数認められた。

文 献

- 1) 内田俊和：ウイルス肝炎—組織と鑑別診断—，中外医学社，1983
- 2) 市田文弘：肝炎ウイルス研究の歷程，診断と治療，12：2829—2832，1988
- 3) 岡本宏明ほか：B型肝炎ウイルス・デルタ肝炎ウイルス，診断と治療，12：2839—2849，1988
- 4) 志方俊夫：非A非B型ウイルス，診断と治療，12：2851—2856，1988
- 5) 飯野四郎：肝炎ウイルスマーカーの検査と意義，診断と治療，12：2859—2864，1988
- 6) 藤沢冽：非A非B型肝炎，診断と治療，12：2885—2891，1988
- 7) 武藤泰敏：劇症肝炎，診断と治療，12：2892—2899，1988