

家兎肺臓における実験的結核性空洞の形成に関する研究

V. 結核菌菌体成分による空洞の形成

山口正民・小川彌榮・遠藤一男・竹内弘之

中村 滋・矢坂 茂・山村雄一

国立療養所刀根山病院 (院長 渡辺三郎博士)

大阪市立大学刀根山結核研究所 (渡辺三郎教授)

受付 昭和32年7月10日

第1章 緒 言

われわれはすでにウサギの肺臓に人間の結核性空洞と類似した空洞を高率に作成する方法を考案し¹⁾、ついでその空洞形成の機作が結核のアレルギー反応(抗原抗体反応)を基盤として惹起せられることを報告し²⁾、さらにその抗原活性因子が結核菌体から無細胞性に抽出された流動パラフィン可溶性物質中に存在することも明らかにした³⁾。

今回は上述の抗原抗体反応に關与する抗原の活性因子が結核菌体の如何なる部分に存在するかを明らかにする目的をもつて、結核菌体から脂質、脂質と蛋白質の結合物であるリポ蛋白質および培養濾液からツベルクリン蛋白質をそれぞれ抽出して、実験的結核性空洞の形成実験を行い、抗原活性の有無について比較検討した。

第2章 実験方法

〔1〕 結核菌によるウサギの感作

ウサギは体重 2.5 kg 前後のツベルクリン反応陰性の健康な成熟ウサギを選び(雌雄を問わない)、第1報において述べた方法¹⁾に従つて感作を行い、ツベルクリン反応を陽性転化せしめた。

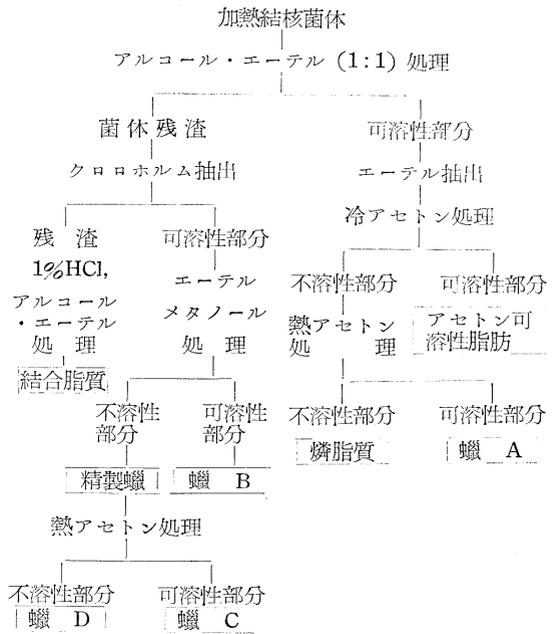
〔2〕 二次抗原(肺内注射物質)の調製法および肺内注射法。

1) 脂質画分の抽出および実験

Sauton 培地培養 6~8 週目の BCG を 100 度 30 分の加熱により死菌とし、この菌体を用いて表 1 に示す如く Anderson⁴⁾ および Lederer⁵⁾ の方法に従つて抽出を行った。すなわち死菌菌体を滅菌蒸溜水で数回洗滌後、アルコール・エーテルの等量混合液の 5 倍容量を添加して約 4 週間 incubate し(4°C)、この間ときどき振盪して抽出を容易にした。ついで濾過、遠沈により抽出液と残渣に分け、抽出液はさらに Chamberland L₃ を通して菌体を確実に除去した。次にこの抽出液を表 1 の如く処理して、アセトン可溶性脂肪 1.3 g, 蠟 A 100 mg, フォスフ

ァチッド 1.3 g を得た(いずれも湿量 550 g の菌体より)。また残渣 400 g に約 8 倍量のクロロホルムを添加して 5°C で約 4 週間抽出を行い、Chamberland L₃ を用いて菌体を除去して表 1 の如き操作を行つて、精製蠟

表 1 菌体脂質の抽出法



9.65 g (蠟 D 1.65 g, 蠟 C 2.65 g), 蠟 B 0.7 g, 結合脂質 0.4 g を得た。

肺内注射はアセトン可溶性脂肪, 精製蠟, 蠟 B, および結合脂質の各 3 mg を流動パラフィン 0.1 ml に溶解して、感作ウサギと非感作ウサギの肺臓内に直接注射を行った。

2) リポ蛋白質の抽出および実験

菌体からのリポ蛋白質の抽出は, Folch⁶⁾ らの牛脳からリポ蛋白質を抽出した方法に従つて表 2 に示す如く行った。すなわち前述の脂質抽出の場合と同一の方法によ

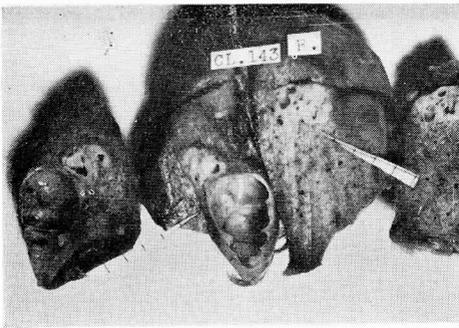


図 1

感作ウサギのリボ蛋白質 3mg 注射 14 日後の空洞

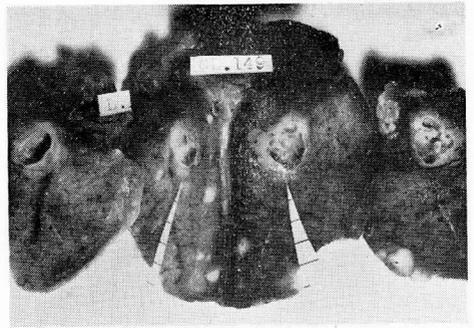


図 2

感作ウサギのリボ蛋白質 1mg 注射 25 日後の空洞

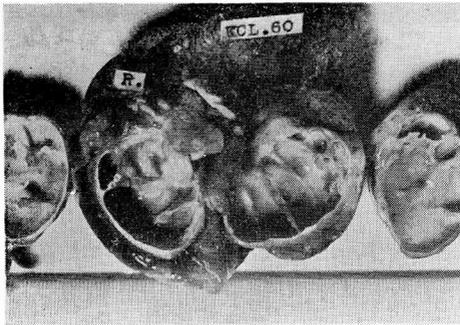


図 3

非感作ウサギのリボ蛋白質 3mg 注射 60 日後の空洞

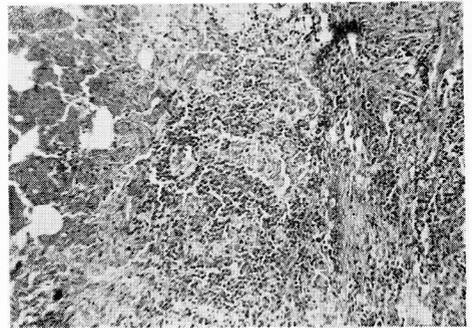


図 4

リボ蛋白質 0.5mg 注射 25 日後の空洞壁 (左から順に壊死層, 肉芽層, 線維層がみられる)

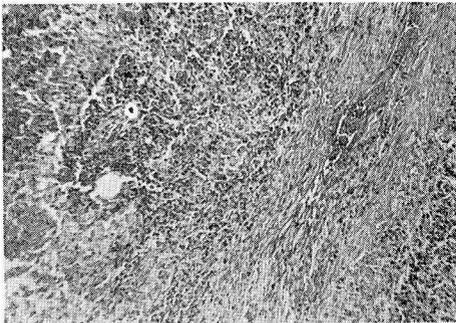


図 5

リボ蛋白質 1mg 注射 25 日後の空洞壁 (左から順に壊死層, 肉芽層, 線維層がみられるが, ことに血管周辺から著しい線維の増殖がみられる)

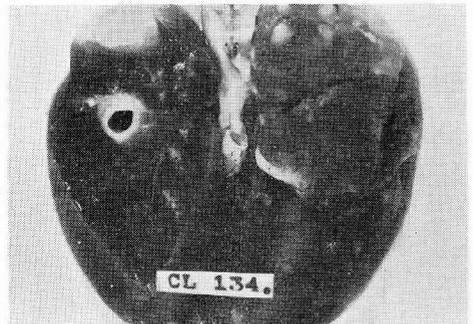


図 6

ツベルクリン蛋白質 3mg 注射 30 日後の空洞

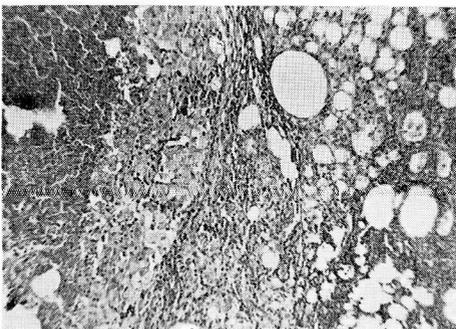


図 7

←ツベルクリン蛋白質 3mg 注射 30 日後の空洞壁 (左から順に壊死層, 肉芽層, 線維層があるかといずれもリボ蛋白質による空洞壁のそれよりも軽度である)

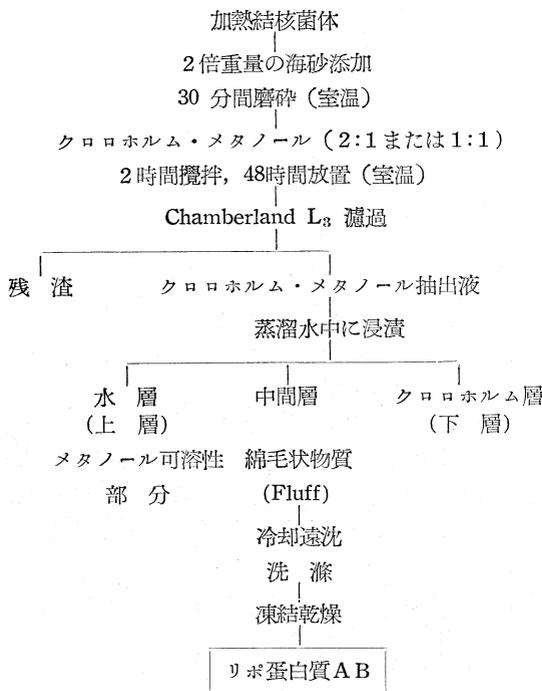
つて得たBCG加熱死菌菌体に約2倍重量の海砂を加えて約30分間磨砕し、ついで約5倍量のクロロホルム・メタノール(2:1または1:1)混合液を添加し、約2時間攪拌後、48時間室温で incubate した。つぎに遠沈により菌体の大部分を除去し、さらに抽出液を Chamberland L₃ を通して濾過し、琥珀色透明な抽出液を得た。

この抽出液に約20倍量の滅菌蒸溜水を重層し、4°Cで48時間静置すると3層に分離する。

すなわち上層はメタノールを含む水層であり、下層はクロロホルム層であつて、中間層に水、メタノール、クロロホルムのいずれにも溶解しない白色綿毛状の物質(Fluff)を生ずる。

水層はサイフォンによつて除去し、他の2層は凍結および遠沈によつて分離し、Fluff はさらにクロロホルム・メタノールおよび水処理を反復して精製した後、凍結

表2 リポ蛋白質の抽出法



乾燥して白色粉末の物質としてうる。この物質は Folch が牛脳から分離したリポ蛋白質 AB 画分に相当し、そのN量は約3%であつた。

以上の操作によつて得られたリポ蛋白質 AB の一定量をそれぞれ流動パラフィン 0.1 ml に溶解して感作ウサギおよび非感作ウサギの肺内に直接注射した。

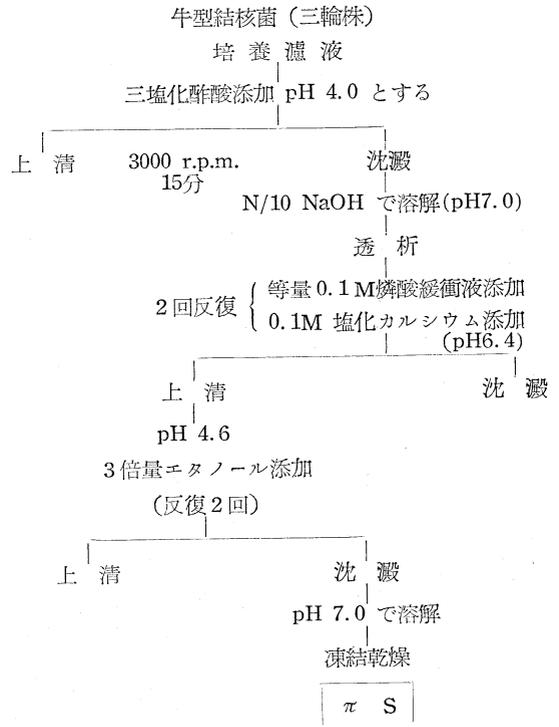
3) ツベルクリン蛋白質の調製および実験

牛型結核菌(三輪株)のキルヒナー氏無蛋白培地培養8~12週目の培養濃液より戸田⁷⁾らの方法に従つて表3の如くπS画分を得た。

このツベルクリン蛋白質の含有N量は平均約10%であ

つた。このπS画分の一定量を少量の蒸溜水に溶解し、さらに流動パラフィン 0.1 ml に浮遊して、感作ウサギおよび非感作ウサギの肺内に直接注射した。以上の如く各菌体成分をウサギの肺臓内に注射した後、毎週X線撮影によつて空洞の形成経過を観察し、一定の日数後、ウサギを瀉血によつて屠殺し、形の如く肺臓を処理して、肉

表3 ツベルクリン蛋白質 πS の調製法



眼的ならびに病理組織学的に空洞の形成について比較検討を行つた。

第3章 実験成績

A) 肉眼的所見

1) 脂質画分による空洞形成実験

成績は表4の如く、アセトン可溶性脂肪を注射した感作群および非感作群にそれぞれ1例の空洞形成が認められたが、他の全例には、注射局所に限局性の増殖性病巣のみを認めて、乾酪化や空洞形成は全く認められなかつた。

したがつて脂質画分は空洞の形成に対しては抗原作用はほとんどないといつてよい。

2) リポ蛋白質による空洞形成実験(図1.2)

その成績は表5の如く、リポ蛋白質の3mgを感作ウサギの肺内に注射した場合は極めて早期に(注射後14日以内に空洞の陰影をレントゲン撮影によつてとらえることができる)、かつ高率に(7例中6例に)、空洞が形成

表 4 結核菌菌体の脂質画分による空洞形成

家 兎 番 号	二 次 抗 原		* 感 作 の 有 無	肺内注 射後剖 割見ま での日 数		** 空 洞 の 形 成	空 洞 形 成 家 兎 番 号
	脂 質 画 分	量		30日	60日		
CL122— 127	アセトン 可溶性脂 肪	3mg	+	30日	1/3	CL127	
				60	0/3		
KCL42— 47			-	30	1/3	KCL46	
				60	0/3		
CL104— 109	蠟 B	3mg	+	30	0/3		
				60	0/3		
KCL24— 29			-	30	0/3		
				60	0/3		
CL110— 115	精製蠟	3mg	+	30	0/3		
				60	0/3		
KCL30— 35			-	30	0/3		
				60	0/3		
CL116— 121	結 合 脂 質	3mg	+	30	0/3		
				60	0/3		
KCL36— 41			-	30	0/3		
				60	0/3		

備考 * 第1報記載の如く行つた。
** 分母は供試家兎数, 分子に空洞形成の家兎数

せられた。また 0.1 mg の注射においても空洞が形成 (5例中3例) せられるが、この場合には3 mg群に比べると形成までに長期間(25~50日)を必要としている。しかるに抗原量を 0.05 mg 以下にすると50日間の長期観察においても1例の空洞形成も認められず、増殖性繁殖

表 5 結核菌菌体のリポ蛋白質による空洞形成

家 兎 番 号	感 作* の 有 無	二 次 抗 原		二 次 抗 原 注 射 後 剖 割 見 ま での 日 数	空 洞** の 形 成	空 洞 形 成 家 兎 番 号
		肺内 注 射	量			
CL52,55 CL141~ 145	感 作 群	Proteo- lipid A B の流動 パラフ イン浮 遊液の	3mg	14日	6/7	CL52, 55, 142, 143, 144, 145
CL146~ 150			1mg	25日	3/4	CL147, 148 149
CL151~ 155			0.5 mg	25日	3/5	CL152, 154 155
CL180~ 185			0.1 mg	25日	2/3	CL180, 183
CL186~ 191			50日	1/2	CL185	
CL192~ 197			0.05 mg	50日	0/6	
KCL60~ 69	非感作群	同 上	3mg	25日	2/5	KCL62, 68
				60日	3/4	KCL60, 61, 64

備考 * 感作は第1報の如く行つた。
** 分母は供試家兎数, 分子は、空洞形成家兎数

性の病巣を形成せしめるのみであつた。また非感作ウサギにおいては、二次抗原量 3 mg を用いた場合には 25~60日の観察で9例中5例に空洞の形成がみとめられた。すなわち流動パラフィン抽出物の場合と同様に、感作群に比して空洞形成にかなり長期間(約 10~14日間)を要している。これはリポ蛋白質自身がウサギを結核アレルギー化する作用を有しており、空洞形成が遅延するもの、このアレルギー化に要する期間であり、空洞の形成は結核のアレルギー反応を基盤として行われることを示唆している。

3) ツベルクリン蛋白質による空洞形成実験(図6) その成績は表6の如く、感作ウサギにおいては二次抗原として πS画分の 3mg を注射した場合には、30~60日間に 10例中5例の空洞形成を認めた。また 0.5 mg

表 6 ツベルクリン蛋白質による空洞形成

家 兎 番 号	感 作*	二 次 抗 原		肺内注 射より 剖割迄 の日 数	** 空 洞 形 成	空 洞 形 成 家 兎 番 号
		肺内注 射画分	量			
CL128~ 139	感 作 群	π-S	3mg	30日	3/5	CL128, 131, 134
				60日	2/5	CL137, 139
CL244~ 247		0.5 mg	30日	2/4	CL247, 246	
				0/3		
CL204 205 215		0.1 mg		0/3		
KCL 48~59	非感作群	π-S	3mg	30日	0/6	
				60日	0/6	

* 感作は第1報の如く行ふ。
** 分母は供試家兎数, 分子は空洞形成家兎数

の注射によつても4例中2例に空洞の形成が認められた。しかしこれらの空洞は周局炎の少ない比較的壁の薄いものであつた。また非感作ウサギにおいては全く空洞の形成が認められなかつた。

B) 組織学的所見

1) 脂質画分による病巣

局所は注射された物質を囲んで類上皮細胞, 単核細胞および少数の白血球の浸潤がある。

多少の充血や滲出液を見るところもあるが壊死の傾向はほとんどなく、繁殖性の反応が主体である。注射部の周辺には胞隔の肥厚および細胞浸潤がみられ、また小気管支の拡張や、ところによつてはその増生がある。血管の周辺にはリンパ球や形質細胞の増殖している像がしばしばみとめられる。病巣にはかなり著明な好銀線維の増殖があるが周辺部に線維性の被膜形成はみとめられない。病変部には肺胞内に注射された物質が充満して、胞隔が次第に肥厚し細胞浸潤が進むあらゆる移行像がみられる。このことから脂質画分に対して徐々に反応して胞隔の肥厚、細胞浸潤がすすみ、一方肺胞内への細胞滲出

が加わつて繁殖性の病巣を形成するものと考えられる。

2) リポ蛋白質による空洞壁および病巣(図4,5)

空洞壁は壊死層, 肉芽層, 線維層からなり, さらにその周辺には周局炎および無気肺, 時には気腫の像がみとめられる。壊死層には破壊された細胞の核片や, 退行変性に陥つた核がみられ, また一般に白血球, ことにエオジン好染性の顆粒をもつたものが多い。ところによつては壊死部が融解脱落して肉芽が空洞内面に露出しているところもある。肉芽層は類上皮細胞および単核細胞からなり, また少数の白血球の浸潤をみとめる, またところによつてはリンパ球や形質細胞の集団がみられる。肉芽の外側には線維層があり, ことに肋膜や血管および気管支壁からの線維の増殖が著明である。しかしところによつては厚い肉芽層が線維性被膜をみとめずにそのまま周辺の肺組織に移行することもある。線維層の内または外側において小気管支の著しい増殖をみることがある。空洞の周辺にはかなり強い周局炎がみとめられる。灌注気管支の開口部では気管支上皮に多少の細胞浸潤をみるが, 概して炎症性変化に乏しく, しばしば空洞内面に向つて背の低い上皮が延びて行くのを見ることがある。

以上は感作ウサギにおける空洞壁の所見であるが, 非感作群にできた空洞壁の所見も, 本質的にはほぼこれと異なる。ただし非感作群の空洞はたまたま膨隆した巨大空洞に近いものであつたため, 若干その様相を異にしているが, このような大空洞についてはなお検討を要すると思われる。空洞を形成していない場合の注射局所の病巣は, 感作群においては, 局所は類上皮細胞, 単核細胞および形質細胞からなる繁殖性病変を示し, 部分的に小さい壊死巣がみられる。

白血球はほとんどみとめられない, このような注射局所では壊死の有無にかかわらず好銀線維の増殖は少ない。周辺には格子線維や膠原線維の増殖があり空洞壁の線維性被膜に一致した像を呈している。

非感作群では部分的に極めて小さい壊死が稀にある。注射局所では好銀線維は一般に感作群より多いが周辺では被膜の形成はほとんどみとめられない。また感作群と異なり周局炎が軽度で正常肺組織と鋭利に限界されている。

3) ツベルクリン蛋白質による空洞および病巣(図7)

空洞壁は同様に壊死層, 肉芽層, および線維層から成つているが, いずれの層もリポ蛋白質による空洞のそれよりも極めて菲薄で, またしばしば壊死物質が脱落して肉芽層を露出し, あるいはさらに増殖した気管支上皮によつて露われているのを見ることが多い。壊死層には破壊された細胞や核の碎片がみられるが, 乾酪性肺炎のような一様な無構造の壊死を示すところは少なく, ほとんどすべての場所では核のヘマトキシリンに対する染色性が著しく低下してはいるものの, なお胞体や核の輪廓を

わずかながら残している。肉芽層は類上皮細胞および単核細胞からなり, また形質細胞や白血球をかなり多数にみとめるところもある。肉芽層を囲んで幼若な線維細胞からなる菲薄な線維層がある。線維層は肋膜や血管あるいは気管支に近い部分ではかなりよく発達しているが, それ以外のところでは肉芽層が直接周辺の肺組織へ移行していることが多い。空洞周辺の周局炎は一般に軽度である。このようにツベルクリン蛋白質による空洞とリポ蛋白質による空洞との差異は, 抗原抗体反応, 就中アレルギー反応における両物質の反応力の差に基づくものと思われる。

空洞を形成しない場合の注射局所の組織学的所見は, 感作群においては一般に軽度の壊死に陥つているが, なお壊死に至らない細胞増殖部がかなり残つている。好銀線維はほとんど全く増殖していないが, 周辺には被膜の形成がみとめられる。

非感作群では局所がほとんど吸収されていて, 軽度の胞隔の肥厚のみをみとめるものがあり, 多少とも肺胞が残つている。一般に類上皮細胞は少なく, 単核細胞と白血球が主である。ところによつては結節様の病変部があるが壊死は全くみとめられない。

第4章 考 案

最近結核菌から抽出精製された蠟成分, または高分子の1種の糖脂質(Lipopolysaccharide)の生物学的作用は, フランスおよびアメリカの研究者によつて注目されている。例えば, Blochの“Cord factor”, LedererおよびAsselineauの蠟D画分, ChoucroonのPMKOなどは, 菌の毒力, 抗酸性, 抵抗性獲得, 結核アレルギー化, 結核結節の形成などに重要な役割を演じているとされている。しかし抗原抗体反応の立場にたつた結核菌リポ蛋白質の抗原性に関する研究は, 未だ全く知られていない。

われわれの実験成績によると, 菌体由来するリポ蛋白質によつても, あるいは蛋白質によつてもウサギの肺臓に空洞が形成されるとすると, そのいずれが実際の結核性空洞の形成に主役を演じ, またいかなる機構のもとに作用しているかを検討してみる必要がある。

リポ蛋白質と蛋白質によつて形成された空洞を比較してみると, 表7の如く, リポ蛋白質はウサギをアレルギー化する作用を有しており, 空洞形成に要する量も蛋白質に比して少量で有効であり, また空洞の形成率も高い。その空洞は壊死乾酪巣も広汎で, 乾酪物質も多く, これをとり囲む結核性肉芽層も厚く, したがつて治癒傾向も少ない。これらの性状を全体としてみれば, リポ蛋白質により形成される空洞は, 菌体を使用してつくられた空洞に相似している。これに反して蛋白質画分により感作されたウサギに形成された空洞は, むしろ卵白アルブミ

ンを抗原として形成された空洞³⁾に相似している。

したがって肺の実質組織に崩壊と壊死をひきおこして、空洞形成をひきおこす過程には、共通な基本的反応として、アレルギー反応が重要な役割を演じているのであろうが、著明な乾酪化巣の形成や結核性肉芽層の生成など、結核としての特異性炎症像を規制するものは、菌体

表7 リポ蛋白質とツベルクリン蛋白質により形成された空洞の比較

抗 原	リポ蛋白質	蛋白質	
感 作	必 ず し も 必 要 と し な い	必 要	
感作家兔における空洞形成に要する量	100γ	500γ	
生 成 率	高 い (感作家兔ではほとんど100%)	低 い (50%)	
空洞の性状	壊死乾酪巣	広汎多量	眼局性少量
	肉芽層の厚さ	厚 い	薄 い
	周局炎	強 い	弱 い
一 般 所 見	菌体を使用しているときに相似	卵白アルブミンを使用したときに相似	

表8 空洞壁の組織学的所見

		結核菌体成分		
		結核菌体 生菌ならびに死菌	リポ蛋白質	蛋白質
壊死乾酪巣		最も多い	多 い	少 ない
肉芽層	厚 さ	厚 い	厚 い	薄 い
	類上皮細胞	+	+	+
	巨細胞	+	-	-
	好銀線維	+	+	+
周局炎		+	+	-

リポ蛋白質であると思われる。すなわち古くから注目されている結核菌の脂質と、アレルギー反応の抗原として

重要な蛋白質との両者の結合物の生物学的な作用はさらに注目されるべきであろう。

第5章 結 論

われわれの実験的結核性空洞は結核の抗原抗体反応〜アレルギー反応を基盤として形成せられ、その反応にあずかる抗原活性因子は菌体リポ蛋白質であることが明らかとなった。

しかしながら空洞の形成とアレルギー反応との両者をつなぐ詳細な機構については将来の研究に期待するところが多い。

(本論文の要旨は第4回日本アレルギー学会総会および第10回日本結核病学会近畿地方会において発表した)。

稿を終るに方り、御校閲と御鞭撻を賜わつた院長渡辺三郎博士に謹みて謝意を表する。

文 献

- 1) 山村雄一・矢坂茂・山口正民・遠藤一男・岩倉弘之・中村滋・小川彌栄：結核，29：143，1954.
- 2) 山村雄一・矢坂茂・中村滋・小川彌栄・山口正民・遠藤一男・岩倉弘之：結核，29：361，1954.
- 3) 山口正民・小川彌栄・遠藤一男・竹内弘之・矢坂茂・中村滋・山村雄一：結核，30：521，1955.
- 4) R. J. Anderson and E. Gilman Roberts: J. Biol. Chem., 85: 529, 1930.
- 5) J. Asselineau et E. Lederer: Bull. Soc. Chim. Biol., 35: 661, 1953.
- 6) J. Folch and M. Lees: J. Biol. Chem., 191: 807, 1951.
- 7) 戸田雄雄：綜合研究結核研究班報告，1953年11月.
- 8) Y. Yamamura, S. Nakamura, Y. Ogawa and S. Yasaka: Amer. Rev. Tuberc. and Pulmon. Dis., 75: 99, 1957.