

# 乾酪巢の人為的軟化融解に関する基礎的研究

大 沢 義 信

結核予防会結核研究所

受付 昭和 35 年 5 月 10 日

## 緒 言

乾酪巢の軟化に関し、Rich (1951)<sup>1)</sup> は肺における病巢の軟化は好ましくないと述べているが、他方、辻 (1950)<sup>2)</sup> は浄化はもつとも自然な治癒反応であり、浄化作用を完全ならしめることに成功すれば必ずしも Raum を塞ぐ必要はないと述べている。このことは影山・青木 (1955)<sup>3)</sup> が主張したように化学療法といえども従来の自然治癒の速度と程度を変えるにすぎないということを肯定するならば今日なお当を得たものであり、とくに転移の危険性が少なくなった現在では一層望ましいものとすらなっている。この事情を島村 (1960)<sup>4)</sup> は化学療法時代に入ってから致命的進展はごく慢性にしか起こらないが、しかし重症化した了えば内科的には開放性治癒を期待するほか積極的療法はないと述べている。

かくて、軟化融解を決定する因子を理解することはきわめて重要なことであるが、Pagel (1930)<sup>5)</sup>、辻 (1944)<sup>6)</sup>、Rich (1951)<sup>1)</sup> らの総説をみてもまだ決定的な説明は与えられていない。しかし、Rich (1951)<sup>1)</sup> が軟化の意味は生体内で固形の凝固蛋白質が液状あるいは半液状に変化することである以上、この変換はおそらく蛋白分解酵素によるもので、他の試験管内では可能でも生体には適用されえない方法によるものではないと考えるのが妥当であると述べていることによつても、軟化融解の過程はある種の酵素反応と考えられ、結局、それにたずさわる酵素とその反応の場との関係において解明されるべきものであろう。

著者は人為的に乾酪巢を軟化融解して開放性ないし癩痕治癒に導くことを最終目的とし、まず、主として蛋白質よりなる乾酪物質の *in vitro* における融解にトリプシンを用い、そのさい、障害となる脂質のトリプシンに対する作用機序を解明し、それに基づき脂質の阻害作用を除去する方法の探索を目指して基礎的研究を進め、さらに各因子の影響をあわせ検討した結果みるべき成績を得ることができたのでここに報告する。

## 歴 史 的 考 察

今、主として酵素についてなされた報告を一覧すれば、それらは所詮酵素の由来に関する記述に帰するようである。すなわち、その①は死細胞に由来するとするも

ので、この説を支持するか、あるいはこの説の裏付けをなすと考えられるものには Utkin-Ljubowzow (1925)<sup>7)</sup>、Steppuhn & Duret-Delage (1927)<sup>8)</sup>、Utkina-Ljubowzowa & Steppuhn (1929)<sup>9)</sup>、辻 (1944, 1948)<sup>6)</sup><sup>10)</sup>、Rich (1951)<sup>1)</sup> 等の報告があり、他方、これを否定するものには Opie & Barker (1908)<sup>11)</sup>、寺松ら (1956)<sup>12)</sup> 等の報告がある。しかし、さらに、pH の不適当なことや阻害物質の存在等のために不活性状態にある酵素の存在を否定できないとの Weiss ら (1951)<sup>13)</sup> や Jobling ら (1914)<sup>14)</sup> の文献もみられる。その②は病巢内の結核菌に由来するとするもので、Corper ら (1918)<sup>15)</sup> の結核菌に蛋白分解酵素が存在するとの報告があり、また軟化部に菌の増殖が著明にみられることは広く知られている。しかし、Wells & Long (1932)<sup>16)</sup> は結核菌の蛋白分解酵素は活性が低いといい、Weiss ら (1951)<sup>13)</sup> も酵素活性の高い炎症部に菌が少なく、活性のほとんどない軟化部に菌の多いことを実験的に認め菌由来説を否定している。その③は白血球から由来するとするものあるいはそれに論拠を与えている報告であつて、Simon (1901)<sup>17)</sup>、Lord (1919)<sup>18)</sup>、Nye (1922)<sup>19)</sup>、Medlar (1926)<sup>20)</sup>、Huebschmann (1928)<sup>21)</sup>、Sabin, Doan & Forkner (1930)<sup>22)</sup>、Husfeld (1931)<sup>23)</sup>、Weiss & Czarnetzky (1935)<sup>24)</sup>、Rich (1951)<sup>1)</sup>、寺松ら (1956)<sup>12)</sup>等のものがそうであるが、Pagel (1930)<sup>5)</sup> は融解に対し細胞や混合感染を必要としないと述べ、Long (1935)<sup>25)</sup> もまた細胞の意義を認めていない。

次に酵素反応の場に関する病理学的研究はきわめて多いが、ここには融解とアレルギーの関係を論じたものにとどめておく。山村ら (1954)<sup>26)</sup> は家兎を用いた実験的肺空洞形成にさいしアレルギー状態において、より高率に空洞形成が起こることを示し空洞発生にアレルギーが関与すると説明している。しかし、北沢 (1960)<sup>27)</sup> は人型菌を家兎に経気道感染したさい初感染群にて空洞が高率に発生したことから山村に反対している。

さて、化学療法時代に入ってから軟化融解に関して注目されたものは INAH と副腎皮質ホルモンであろう。Curci (1953)<sup>28)</sup> は INAH が乾酪物質の融解を促進したと発表し、Denst (1953)<sup>29)</sup> は切除肺所見から、Düggeli ら (1953)<sup>30)</sup> は臨床的に INAH の浄化作用を認めている。わが国においても熊谷ら (1955)<sup>31)</sup> をは

じめ多くの発表がなされている。なお INAH の作用機序について寺松 (1958)<sup>32)</sup> は特殊作用を報じているが香川ら (1956)<sup>33)</sup> は動物実験にて SM にも浄化および癩痕治癒に導く作用のあることを認め INAH に特有の現象ではないと否定している。

Popp ら (1951)<sup>34)</sup> はコーチゾンによる空洞形成を報じており、コーチゾンによる病巣の融解排除が期待されたが、青木ら (1958)<sup>35)</sup> はブレドニソロンによる経験から少なくとも使用した dose の範囲では著明な融解を示す証拠を得られなかったと述べている。

胸部疾患に酵素製剤を使用する試みはかなり以前からなされているが、これらの対象は主として膿胸あるいは血胸に対するものであり、また祛痰の目的で使用されたものが主であつて、ヴァリダーゼを使用した長谷川 (1952)<sup>36)</sup>、ヒアルロニダーゼを使用した Paraf (1952)<sup>37)</sup>、三上 (1952)<sup>38)</sup>、ストレプトキナーゼ、ストレプトドルナーゼを使用した Tillett (1951)<sup>39)</sup>、浅野 (1953)<sup>40)</sup>、トリプシンを用いた Limber (1952)<sup>41)</sup>、Roettig (1952)<sup>42)</sup>、Yates (1953)<sup>43)</sup>、牧野 (1955)<sup>44)</sup>、篠井 (1955)<sup>45)</sup>、鶴田 (1957)<sup>46)</sup> 等の報告がみられるが、空洞切開前の前処置として抗生物質とスプレーゼを使用して空洞の眞通洗滌を行つた天沼 (1959)<sup>47)</sup>、化学療法剤を空洞に直接注入して空洞の治癒をはかり、その効果を上げるためにヒアルロニダーゼを併用した Wipf (1958)<sup>48)</sup> の仕事もある。しかし、乾酪物質の融解排除を主目的としたものは見当たらない。

著者は、人為的軟化融解の実験にあたり、Schmoll (1904)<sup>49)</sup>、Caldwell (1919)<sup>50)</sup>、貝田ら (1956)<sup>51)</sup> がすでに報じているように乾酪物質は主として凝固蛋白よりなること、生体に対する作用が mild であること等の理由から蛋白分解酵素をまず考え、その中では作用の至適 pH が病巣の pH 付近にあり、活性が高く、かつ安定な製剤が容易に入手できる等の長所を有するトリプシンを用いることにした。

かつて、松尾・大沢 (1955)<sup>52)</sup> は切除乾酪巣の凍結切片をトリプシンまたはヒアルロニダーゼ溶液に浸漬し、融解状況を調べたが肉眼的に著明な融解を認めることができなかつた。寺松ら (1956)<sup>12)</sup> もトリプシンによる乾酪物質のホモジェネートの融解はトリプシン濃度がきわめて高いときのみ認められたと報告している。融解の起こりにくい理由としては、Jobling ら (1914)<sup>14)</sup> が病巣中の不飽和脂肪酸の鹼化物が蛋白分解酵素に対し阻害作用を有することを報じており、Wells & Long (1932)<sup>16)</sup> は結核菌が自家融解酵素を阻害あるいは破壊するのではないかと報じ、山村 (1956)<sup>53)</sup> は白血球の蛋白分解酵素に対する菌体ミコール酸の阻害作用をラベルした菌を用いて明らかにした。寺松ら (1956)<sup>12)</sup> は乾酪巣の脂肪および脂肪酸分画がトリプシンおよびペプシン

を強く阻害し、カテプシンをもかなり阻害することを示し、大沢 (1958)<sup>54)</sup> も菌体脂質および病巣より抽出した脂質のトリプシン阻害作用を確認している。また堀沢 (1958)<sup>55)</sup> は組織化学的ならびに生化学的研究によつて脂質の融解に対する阻害作用を強調し、岩井 (1959)<sup>56)</sup> も組織学的に同様の知見を得ている。しかし、これら数多くの知見があるにもかかわらず脂質の酵素阻害作用の機序についての研究はきわめて少なくほとんどみらるべきものはない。

## 試料と方法

本研究に用いたトリプシンは持田製結晶トリプシンで、その 8 mg が 10,000 ハモグロビン単位 (H.U.M.) に相当するもの、カゼインはメルク製の nach Hammarsten、脂肪酸、Span および Tween はアトラスの Tween 80 以外いずれも東京化成のもの、SM は科研の複合、PAS は田辺、INAH は日新、PZA は三共のものをを用いた。また Ca<sup>++</sup>、Mg<sup>++</sup>、Ba<sup>++</sup> はいずれもそれらの塩酸塩の純品を、ミコール酸は青山 B のソートン 2 週培養から Anderson (1927)<sup>57)</sup> の方法に準じて得た蠟成分を 2% KOH イソプロピルアルコール溶液にて鹼化後さらに抽出精製したものであるが、赤外線スペクトル等による純度試験は行なわれていない。

脂肪酸はとくにことわらない限り、いずれも 0°C における N/20 NaOH 飽和溶液を原液 'S' とし、適宜希釈して用いた。緩衝液は、Ca<sup>++</sup>、Mg<sup>++</sup>、Ba<sup>++</sup> を用いる場合には M/15 ベロナール、その他の場合には M/15 磷酸塩を用いた。なお以下の表に示す物質の濃度は反応系に加える溶液の濃度を表わしたもので、終濃度にすれば、反応系 I の場合その 1/10、反応系 II の場合その 1/3 である。

病巣はほとんどの例で SM、PAS、INAH の 2 者ないし 3 者を術前 2 日前まで使用した患者から切除によつて得られた新鮮な標本を用いたが、切除から実験までの時間は一定になしえなかつた。

トリプシンの活性測定には、カゼイン-280 mμ 直接法、乾酪物質を基質とした場合には反応濃液につき大沢 (1958)<sup>58)</sup> の発表した Phenol-Hypochlorit 法によつた。なお反応系の組成は次のごとくにした。

### 反応系 I (カゼイン基質) 一表 1~9 の実験

125 H.U.M./ml トリプシン	1 ml
M/15, pH 7.6 磷酸緩衝液	1 "
試験物質 (脂質, Span, Tween 等)	1 "
0.7% カゼイン	5 "
反応総量	10 "
停止液 (トリクロール酢酸, 氷酢酸, 酢酸ソーダ混液)	5 "

反応系II (乾酪物質基質) 一表10の実験

5,000 H.U.M./ml トリブシン	0.5 ml
70 mg/ml 乾酪巣ホモチエネート	
(M/15, pH 7.6 磷酸緩衝液使用)	0.5 ㇿ
10 % Tween 80	0.5 ㇿ
反応総量	1.5 ㇿ
停止液	20.0 ㇿ

添加した試験物質の効果は、吸光度 A (30°Cにて20分反応した系から得られた) から吸光度 A' (0°Cにて20分放置した系から得られた) を差し引いた値を反応度 R とし、他方、試験物質を含まぬ2つの系から同様にして反応度 RK を求め、R または R と RK の差 Δ にて表現した。したがって、R の値は大なるほど試験物質の促進的効果の大なることを、他方、Δ の値は+のとき促進、-のとき阻害、0のとき無効なることを意味する。

乾酪巣切片の融解実験には生のままの凍結切片を用い、5,000 H.U.M./ml トリブシン溶液、10 % Tween 溶液、M/15, pH 7.6 磷酸緩衝液を各 5 ml 宛含む滅菌シャーレ中にて 37°C に保ち、一定時間後に、ヘマトキシリン-エオジンによる染色標本を作つて観察に供した。

実験成績

1) 脂肪酸のトリブシン活性に対する作用：飽和脂肪酸6種、不飽和脂肪酸4種、そのほかに菌体から抽出したミコール酸を用いた。濃度は、ミコール酸が S の1/5 から 1/500 まで、その他はいずれも M/20 のものを添加した。結果は表1, 3 および 4 にみられるごとく、いずれもトリブシンに阻害的に作用し、その阻害は

表1 脂肪酸のトリブシン活性に対する作用 (脂肪酸濃度: 1/20 M)

脂 肪 酸		C 数	Δ
飽 和	Nカプロン酸	6	- .011
	Nカプリルㇿ	8	- .014
	ペラルゴンㇿ	9	- .029
	Nカプリンㇿ	10	- .021
和	Nウンデカンㇿ	11	- .222
	ラウリンㇿ	12	- .136
不 飽 和	クロトンㇿ	4	- .007
	オレインㇿ	18	- .447
	リノールㇿ	18	- .434
	リノレインㇿ	18	- .407
対 照 (RK)			.587

炭素数11以上のものに強く、同じ炭素数の中では飽和度の異なる酸でやや強い阻害を示した。

2) 脂肪酸のトリブシンに対する阻害作用の機序を明らかにするために脂肪酸のソルビットエステルである Span 20, 40, 60, 80, 85, さらに、ポリオキシエチレンソルビットエステルである Tween 20, 40, 60, 80, 85 を、Span は10 % 溶液、Tween は 20 % から 1/1,000 % 溶液として添加したが、これらにはトリブシンに対する阻害を認められなかつた(表2, 3, 4)。ただ、Span 85 の場合に見掛け上阻害がみられたが、この理由について

表2 Span の種類と打消し効果

試 料	濃 度	Δ <sub>280mμ法</sub>	Δ <sub>呈色法</sub>
Span 20	10%	.066	.022
ㇿ 40	"	.061	.018
ㇿ 60	"	.072	.025
ㇿ 80	"	.077	.028
ㇿ 85	"		- .096
オレイン酸	S・10 <sup>-1</sup>	- .530	- .372
Span 20併用	S・10 <sup>-1</sup> , 10%	- .044	- .001
ㇿ 40 ㇿ	" , "	- .435	- .170
ㇿ 60 ㇿ	" , "	- .473	- .267
ㇿ 80 ㇿ	" , "	- .470	- .263
ㇿ 85 ㇿ	" , "		- .075
対 照 (RK)		.656	.531

表3 オレイン酸・Tween 80 のトリブシン活性に対する作用

試 料	濃 度	Δ
オレイン酸	S・10 <sup>-1</sup>	- .341
	" 10 <sup>-2</sup>	- .303
	" 10 <sup>-3</sup>	.000
	" 10 <sup>-4</sup>	.000
Tween 80	20 %	.105
	10 "	.040
	1 "	.055
	10 <sup>-1</sup> "	.038
	10 <sup>-2</sup> "	.024
併 用	10 <sup>-3</sup> "	.022
	S・10 <sup>-1</sup> , 20 "	.135
	ㇿ , 10 "	.040
	ㇿ , 1 "	- .026
	S・10 <sup>-2</sup> , 20 "	.089
	ㇿ , 10 "	.066
	ㇿ , 1 "	.032
S・10 <sup>-3</sup> , 20 "	.176	
対 照 (RK)	ㇿ , 10 "	.018
	ㇿ , 1 "	.059
対 照 (RK)		.371

表4 ミコール酸・Tween 80 のトリプシン活性に対する作用

試料	濃度	Δ
ミコール酸	S · 2 · 10 <sup>-1</sup>	- .273
	" 10 <sup>-2</sup>	- .150
	" 10 <sup>-3</sup>	- .100
Tween 80	20 %	.062
	10 "	.073
	1 "	.017
併用	S · 2 · 10 <sup>-1</sup> , 20 %	.075
	" , 10 %	.077
	" , 1 %	.002
	S · 2 · 10 <sup>-2</sup> , 20 "	.092
	" , 10 "	.025
	" , 1 "	.041
	S · 2 · 10 <sup>-3</sup> , 20 "	.067
	" , 10 "	.046
	" , 1 "	.034
対照 (RK)		.332

表5 オレイン酸と Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>, Ba<sup>++</sup> のトリプシン活性に対する作用

試料	濃度	Δ
Ca <sup>++</sup>	1/25 M	.133
Mg <sup>++</sup>	"	.085
Ba <sup>++</sup>	"	.049
Ca <sup>++</sup> 併用	S · 10 <sup>-2</sup> , 1/25 M	.081
	" , 1/125 "	.001
Mg <sup>++</sup> "	" , 1/25 "	.370
	" , 1/125 "	.194
Ba <sup>++</sup> "	" , 1/25 "	.250
	" , 1/125 "	.162
対照 (RK)		.499

ては後述する。なお本実験では、Span を用いた場合反応濾液が白濁して 280 mμ 直接法を適用できない場合もあつたので呈色法<sup>58)</sup>をもあわせ行なつた。

3) オレイン酸と Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>, Ba<sup>++</sup> のトリプシン活性に対する作用：2) と同様の目的でオレイン酸の不溶性塩を作りトリプシンに対する作用をみたのが表5で、この結果から、これらの不溶性塩には阻害作用のないことが知られる。なお Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>, Ba<sup>++</sup> もトリプシンに阻害作用はなかつた。

4) オレイン酸のトリプシン阻害作用に対する Span の打消し効果：Span はその脂肪酸残基によつて他の脂

質に結合することが知られているので、トリプシン活性を阻害するオレイン酸と併用した場合、その作用を打ち消す効果のあることが予想できる。そこで10% の Span 20, 40, 60, 80, 85 を S の 1/10 のオレイン酸とともに反応系に加えてトリプシン活性を調べた結果、いずれにも不完全ながら打消し効果を認めえた(表2)。なお Span の溶解度は 20 と 85 がやや高く、他はむしろ溶解しにくかつたが、実験結果は比較的易溶性の Span を併用した場合に打消し効果の大きいことを示した。

5) オレイン酸およびミコール酸のトリプシン阻害作用に対する Tween の打消し効果：4) と同様の観点から実験を行なつた結果、表3, 4 にみられるごとく、併用の場合、オレイン酸濃度の高い S の 1/10, Tween 濃度の低い 1% の場合不完全であつた以外、いずれも完全な打消し効果を示した。

6) Tween の種類と打消し効果：Sの1/10 および 1/100 のオレイン酸と 10% の Tween 20, 40, 60, 80, 85 を併用して Tween の種類による打消し効果の優劣を調べたのが表6で、この結果より Tween はいずれも完全な打消し効果を示し、とくにその効果はアトラスの Tween 80 が優れていることが知られた。

表6 Tween の種類と打消し効果

試料	濃度	Δ · 1/10
オレイン酸	S · 10 <sup>-1</sup>	- .040
	" 10 <sup>-2</sup>	- .033
Tween 20 併用	" 10 <sup>-1</sup> , 10 %	.057
	" 10 <sup>-2</sup> , "	.046
Tween 40 "	" 10 <sup>-1</sup> , "	.058
	" 10 <sup>-2</sup> , "	.048
Tween 60 "	" 10 <sup>-1</sup> , "	.063
	" 10 <sup>-2</sup> , "	.053
Tween 80 (東京化成) "	" 10 <sup>-1</sup> , "	.059
	" 10 <sup>-2</sup> , "	.045
Tween 80 (アトラス) "	" 10 <sup>-1</sup> , "	.064
	" 10 <sup>-2</sup> , "	.045
Tween 85 "	" 10 <sup>-1</sup> , "	.052
	" 10 <sup>-2</sup> , "	.050
対照 (RK)		.057

7) 反応系の pH と Tween 80 の打消し効果：S の 1/100 のオレイン酸、および 10% Tween 80 を加えた反応系の pH を緩衝液によつて種々に変え Tween 80 の打消し効果を調べたのが表7で、これによれば中性でもつとも効果が少なく、酸性、あるいはアルカリ性で

表7 pHとTween 80の打消し効果  
(オレイン酸:S・10<sup>-2</sup>, Tween 80:10%)

緩衝液	pH	反応度(R)
燐酸塩	6.5	.704
	7.0	.689
	7.5	.770
	7.6	.833
	7.9	.886

表8 添加順序と打消し効果

試料添加順序	濃度	Δ
O W E // W	S・10 <sup>-1</sup>	- .413
// // // //	// 10 <sup>-2</sup>	- .360
// // // // T	S・10 <sup>-1</sup> , 10%	- .240
// // // // //	// 10 <sup>-2</sup> , //	- .116
// T // // W	// 10 <sup>-1</sup> , //	.185
// // // // //	// 10 <sup>-2</sup> , //	.183
W W // // (対照 RK)		.590
O / T + E	S・10 <sup>-1</sup> , 10%	.026
// / //	// 10 <sup>-2</sup> , //	.154
// / T / E	// 10 <sup>-1</sup> , //	.117
// // // //	// 10 <sup>-2</sup> , //	.167
W / W // (対照 RK)		.617

O:オレイン酸, W:蒸留水, E:トリプシン, T:Tween 80  
//:30°C 20分, /:0°C 2分

多いことが明らかとなった。

8) 反応系に対する Tween 80の添加順序と打消し効果: S の 1/10 および 1/100 のオレイン酸とトリプシンを混じ, 30°C に 20 分放置後, 10% Tween 80 を加えた系, オレイン酸, トリプシン, Tween 80 をはじめから含有する系, Tween 80 とトリプシンの混液をオレイン酸に混じた系, オレイン酸, Tween 80, トリプシンを 0°C にて 2 分間隔に連続的に混じた系を作つて実験した結果, 表 8 のごとく最初の系に不完全な打消し効果を認めた以外はいずれも完全な打消し効果を示した。

9) Tween 80 の打消し効果に対する薬物の影響: S の 1/5 のミコール酸と 10% の Tween 80 を加えた反応系にさらに種々濃度の SM, PAS, INAH, PZA 溶液を加えて調べたのが表 9 で, 表によれば, SM, INAH はむしろ Tween 80 の打消し効果を増強し, PAS, PZA は減弱させることを示した。また SM, PAS, INAH の 2 者ないし 3 者を併用した場合には PAS の減弱効果が現われなかつた。

10) 切除病巣均質液の融解に対する Tween 80 の効

表9 薬物と Tween 80 の打消し効果

試料	濃度	Δ
ミコール酸+Tween 80	S・2・10 <sup>-1</sup> , 10%	.040
S M 併用	250 γ/ml	.133
	100 "	.092
	25 "	.045
PAS 併用	2,500 "	- .194
	1,000 "	- .032
	250 "	- .033
INAH 併用	250 "	.022
	100 "	.051
	25 "	.016
PZA 併用	2,500 "	- .228
	1,000 "	- .044
	250 "	- .009
SM・PAS 併用	25, 250 "	.108
SM・INAH "	25, 25 "	.041
SM・PAS・INAH "	25, 250, 25 "	.00
対照 (RK)		.256

表10 切除病巣均質液の融解

Case No.	供試 病巣の 性状	反応度 (R)			
		トリプシン添加		トリプシン無添加	
		Tween 80 +	Tween 80 -	Tween 80 +	Tween 80 -
I	軟化傾向のない乾酪巣	.226	.153		
II		.194	.098		
III		.167	.070		
IV		.063	.044	.019	.008
V		.078	.036	.024	.018
VI		.257	.093	.066	.028
VII		.155	.139	.064	.010
VIII		.165	.063	.040	.012
IX	軟の乾化傾向ある巣	.323	.252		
X		.398	.124	.013	.002
XI		.397	.120	.055	.031

果: 切除病巣均質液を基質とし反応系IIにより, 37°C に 1 時間反応させて Tween 80 の効果を調べた結果が表 10 で, 病巣の性状にかかわらず, いずれもトリプシンによる融解および自家融解が Tween の添加によつて促進されることを示している。

11) 切除病巣の凍結切片のトリプシンによる融解に対する Tween 80 の影響: 図 1 は切除病巣を無菌的 Tween 80, トリプシン, 緩衝液の混液に浸漬, 37°C に 20 時間保つたのちの肉眼的融解所見を示す写真の 1 例で

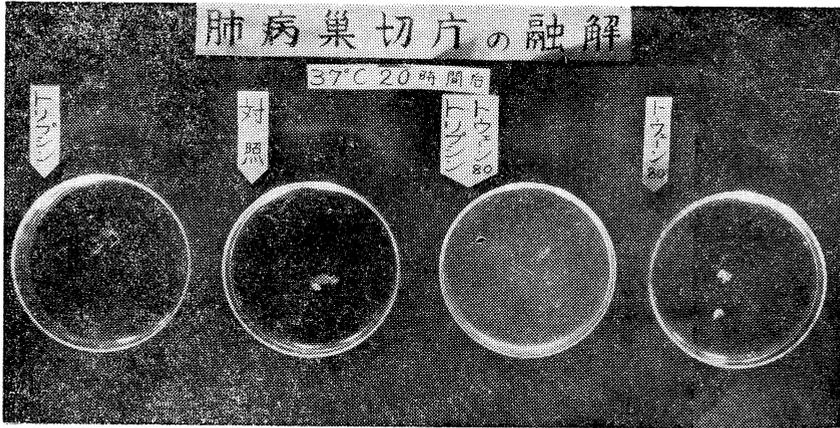


図1 肺病巣切片の融解 (I)

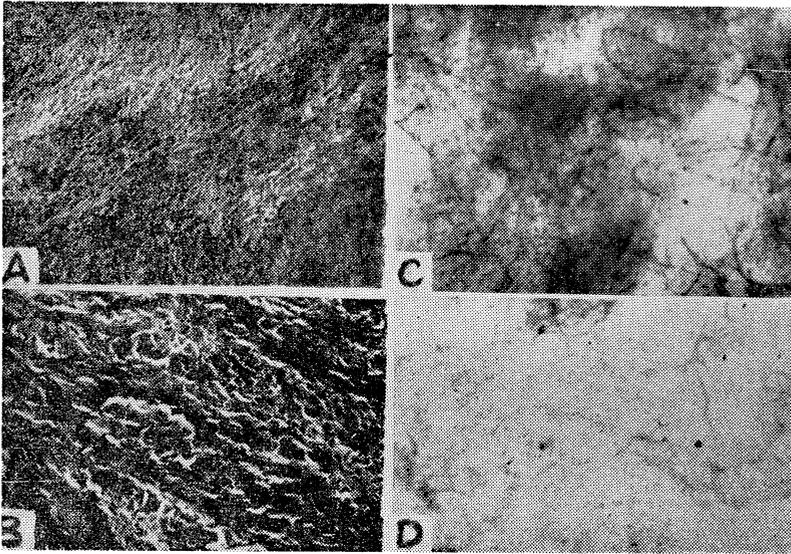


図2 肺病巣切片の融解 (II)

A: 緩衝液のみ      B: Tween 80 + 緩衝液      C: トリプシン + 緩衝液  
D: トリプシン + Tween 80 + 緩衝液

図2はその顕微鏡写真である。図2のAは緩衝液のみに、Bは Tween 80 + 緩衝液に、Cはトリプシン+緩衝液に、Dはトリプシン、Tween 80、緩衝液の混液にそれぞれ浸漬したものをヘマトキシリン-エオジンにて染色したものであつて、実験した他の3例でも顕微鏡的にはトリプシンのみにてもかなりの融解が認められるが、Tween 80 併用の場合さらに著しい融解の起こることを示している。

#### 考 案

著者は人為的に乾酪巣を融解排除して開放性ないし癒痕治癒に導くことを最終目的として、トリプシンによる乾酪物質の *in vitro* における融解に関する研究に着手したが、その当初においてすでに病巣中に含有されると考えられるトリプシン阻害物質のために肉眼的に顕著な

融解を認めぬという障壁に突き当たつた。そこで著者は阻害物質として考えられるムコイド、ポルフィリン、脂質等のトリプシンに対する作用を調べた結果、実験結核兔の肺より抽出したムコイド分画にはトリプシン阻害作用がないことを認め<sup>54)</sup>、またポルフィリンについては Modellversuch としてクロロフィリンのトリプシンに対する作用を系統的に研究し、その阻害作用を確認し、阻害の機序、さらにその脱阻害についても明らかにすることができた<sup>54)</sup>。

本報において著者は脂質のトリプシン阻害作用について研究し、まず脂肪酸は飽和、不飽和のいずれもがトリプシン活性を阻害すること、その阻害は炭素数 11 以上の酸においてとくに強いこと、飽和度の高い酸にやや強い阻害作用のあることを明らかにし、脂肪酸の阻害作用はこれらの酸に共通な  $-COOH$  基に基づくことを示唆

し、次にそれを確認するために脂肪酸の—COOHのHがソルビットとエステル結合することによって失われているSpanおよびポリオキシエチレンソルビットとエステル結合しているTweenのトリプシンに対する態度を調べ、それらにあつては脂肪酸残基をComponentとして含有するにもかかわらず全く阻害作用を示さぬことを認め(Span 85には阻害作用が認められたが、これは使用した濃度においては非常に粘稠なためにchokingすなわち分子運動の阻害が起こつたためと考えられる)、脂肪酸の阻害作用の主体をなすものは—COOHのHであることをほぼ確定的のものとした。著者はさらに、脂肪酸にCa<sup>++</sup>、Ba<sup>++</sup>、Mg<sup>++</sup>のいずれかを加えるとき脂肪酸は不溶性の塩となり、このように脂肪酸が解離しない状態においては、もはやトリプシン活性を阻害しないことを示し、脂肪酸のトリプシン阻害作用はその—COOHのHに基づくことを決定した。

かつて、寺松ら(1956)<sup>12)</sup>は結核病巣の安定化の機転として乾酪巣に含まれる脂質が分解されて酸を生じ、それが病巣外から入ってくるCaと混じり化学的にきわめて安定な状態をとるといつているが、著者の研究によれば少なくとも脂質の酵素化学的阻害作用に関するかぎり脂肪酸がCa塩となることはむしろ融解に導く可能性があると考えられる。しかし、現実にCaの沈着によって病巣が安定化していることはCa塩の不溶性のために酵素反応の場が物理的に硬着せられ、酵素反応に関与する分子の運動を妨げることによって酵素活性を低下させるとともに、酵素の供給源と考えられる白血球の滲入を困難ならしめるためと考えられる。

著者はすでに脂肪酸のトリプシン阻害作用の機序を明らかにしたが、それによれば—COOHのHに基づくわけである。したがつてそのHを置換するかあるいは他の結合によつて不活性化すれば脂肪酸の作用は除去しようと考えられる。SpanやTweenは前述のごとくそれら自身が脂肪酸のエステルであるが、その脂肪酸残基によつてさらに他の脂質と結合することが知られている。そこで著者は脂質としてオレイン酸およびミコール酸を用い、SpanあるいはTweenを併用して脂質のトリプシンに対する阻害作用が除去できるか否かを調べたところ予想通り阻害作用を除去できることを認めた。なおこのさいSpanやTweenの物理化学的効果も疑われるので表面活性を測定したが物理化学的作用によると思われる結果は得られなかった。

次にかかるSpanやTweenの脂質の作用を打ち消す能力がそれらの種類によつてどのような変化を示すかを調べたところ、いずれも打消し作用が認められたが、効果の点でそれぞれ多少の優劣を認めた。しかし、これは本質的な相違ではなく主として溶解性によるものと考えられる。

また、pHとTweenの打消し作用の関係をみた結果酸性およびアルカリ性にて見掛け上の打消し作用が大きくなり、中性付近で小さかつた。このことは酸性側では脂肪酸は不溶性となり、—COOHのHは解離しないためにTweenに無関係にその阻害作用は少なく、またアルカリ側では脂肪酸はよく解離し、Tweenとの結合もまた起こりやすいために脂肪酸の阻害作用が強くなり打ち消されるためと考えられる。

著者はさらにTweenの添加時期について研究した結果、オレイン酸と酵素を混合したのち30°Cに20分放置後Tweenを加えた系では打消し効果を認めたが不完全であつた。しかし、その他の系、すなわち、オレイン酸、酵素、Tweenを始めから混合した系、Tweenと酵素の混液をオレイン酸に混じった系、オレイン酸、Tween、酵素を0°Cにて2分間隔に連続的に混じった系等ではいずれも完全にトリプシン阻害作用を打ち消した。これらの実験はすでに脂質によつて不活性化されている酵素もTweenの添加によつてある程度賦活される可能性を示唆する。事実、このことは病巣ホモチネートにTweenを加えた系で自家融解の促進されることを認めたとによつて肯定されよう。著者は歴史的考察において病巣融解に与かる酵素の由来について一覽したが、Tweenによつて病巣ホモチネートの自家融解を促進したことは、とくにその供試病巣が軟化傾向のない乾酪巣をも含んでいるゆえに、いわゆる、死細胞由来の酵素が融解の主役をなすとはいわれないまでも、条件の如何によつては融解に一定程度関与する可能性を示唆するものと思われる。

次に著者は各種薬物の打消し作用に対する影響を調べ、SM、INAHにはむしろ促進的に、PAS、PZAには阻害的に作用する効果のあることを認めた。このことは、融解に用いる混液にSMやINAHを加えることになり、融解排除機転における転移の懸念を除きうる点で有利である。

以上のことから著者は人為的軟化融解に使用すべき融解剤としてトリプシンを主体としTween、Ca<sup>++</sup>、SM、INAH等を含む弱アルカリ性の溶液が適当であるとの結論を得た。

## 結 語

空洞を開放性治癒ないし癒痕化に導きうると思われる乾酪物質の人為的軟化融解をin vitroにて主として酵素学的に研究した。

乾酪物質の主成分は蛋白であり、他方、トリプシンの作用に適当pHが乾酪物質のpH付近にあることより人為的軟化融解にトリプシンを用いることにした。また、トリプシンは活性が強く、安定な結晶形のトリプシンを商品として容易に入手できることも考慮した。

はじめ、切除乾酪巢の凍結切片を緩衝剤を加えたトリプシンの溶液中にて 37° C に保つてみたが、肉眼的に融解を認めえなかつた。このことは乾酪物質中にトリプシンの阻害物質が存在することを示唆する。そこで、その阻害物質と阻害の減弱法について研究してきた。

その結果：

1) ミコール酸をも含めて飽和および不飽和脂肪酸はトリプシンによるカゼイン分解を阻害し、それらの作用は—COOH の H によると思われた。なぜなら、脂肪酸を成分として含有し、その—COOH の H の位置で他の成分と結合している Span, Tween およびある脂肪酸の不溶性塩はトリプシン活性を阻害しなかつたからである。

2) Span や Tween はさらにそれらの脂肪酸残基を通して他の脂質と結合するので、脂質のトリプシン阻害作用が Span や Tween 添加によつて消し去られると思われるが、この期待は実験的に確認された。そして、基質として乾酪物質を用いた場合も同様に証明された。

3) Tween は軟化の傾向のない乾酪巢の自家融解をも促進した。これは自然の軟化融解にかかわる酵素の一部が死細胞から由来する可能性のあることを示唆する。

4) 脂質の阻害作用に対する Span や Tween の減弱作用に影響する因子を調べた結果、人為的軟化融解には乾酪物質にトリプシン, Tween, Ca<sup>++</sup>, SM, INAH を含む塩基性の溶液を直接接しすることが適当であるという結論を得た。

稿を終るにあたり、たえざる御指導と御校閲を賜わつた当研究所岩崎龍郎研究部長、および御助言と御校閲を賜わつた隈部英雄所長、湯沢健児副所長に御礼申し上げるとともに、病理解剖学および生理生化学研究科員各位の御援助を感謝いたします。

本論文の要旨は第 35 回日本結核病学会総会（1960、福岡）の席上にて発表した。

#### 参 考 文 献

- 1) Rich, A.R. : The Pathogenesis of Tuberculosis, Springfield, 1951.
- 2) 辻周介 : 結核研究, 6 : 1, 昭25.
- 3) 青木卓章編 : 肺結核治療の病理, 東京, 昭33.
- 4) 島村喜久治 : 結核, 35 (特) : 47, 昭35.
- 5) Pagel, W. : Beit. Klin. Tuberk., 76 : 414, 1930.
- 6) 辻周介 : 結核研究, 2 : 242, 昭19.
- 7) Utkin-Ljubowzow, L. : Biochem. Zs., 158 : 50, 1925.
- 8) Steppuhn, O. & Duret-Delage, Y. : Biochem. Zs., 182 : 134, 1927.

- 9) Utkina-Ljubowzowa, X. & Steppuhn, O. : Biochem. Zs., 211 : 426, 1929.
- 10) 辻周介 : 結核研究, 4 : 42, 昭23.
- 11) Opie, E.L. & Barker, B.I. : J. Exp. Med., 10 : 645, 1908.
- 12) 寺松孝・永井純太 他 : 肺, 3 : 207, 昭31.
- 13) Weiss, C. & Boyar-Manstein, M.L. : Am. Rev. Tuberc., 63 : 694, 1951.
- 14) Jobling, J.W. & Petersen, W. : J. Exp. Med., 19 : 383, 1914.
- 15) Corper, H.J. & Sweany, H.C. : J. Bact., 3 : 129, 1918.
- 16) Wells, H.G. & Long, E.R. : The Chemistry of Tuberculosis, Baltimore, 1932.
- 17) Simon, O. : Deut. Arch. Klin. Med., 70 : 604, 1901.
- 18) Lord, F.T. : J. Exp. Med., 30 : 379, 1919.
- 19) Nye, R.N. : J. Exp. Med., 35 : 153, 1922.
- 20) Medlar, E.M. : Am. J. Path., 2 : 275, 1926.
- 21) Huebschmann, P. : Pathologische Anatomie der Tuberkulose, Berlin, 1928.
- 22) Sabin, F.R., Doan, C.A. et al. : J. Exp. Med., 52 (Sup.) : 1, 1930.
- 23) Husfeldt, E. : Zs. Physiol. Chem., 194 : 137, 1931.
- 24) Weiss, C. & Czarnetzky, E.J. : Arch. Path., 20 : 233, 1935.
- 25) Long, E.R. : J.A.M.A., 104 : 1883, 1935.
- 26) 山村雄一・矢板茂 他 : 結核, 29 : 143, 昭29.
- 27) 北沢幸夫 : 結核, 35 (特) : 56, 昭35.
- 28) Curci, G. & Scoles, E. : Arch. Tisiol., 8 : 274, 1953.
- 29) Denst, J. : Am. Rev. Tuberc., 68 : 144, 1953.
- 30) Düggeli, O. & Trendelenburg, F. : Beit. Klin. Tuberk., 108 : 326, 1953.
- 31) 熊谷岱藏・鈴木千賀志 他 : 日本臨牀結核, 14 : 89, 昭30.
- 32) 寺松孝・生嶋宏彦 他 : 肺, 5 : 44, 昭33.
- 33) 香川輝正・伊藤義昭 他 : 診断と治療, 44 : 429, 昭31.
- 34) Popp, C.G., Ottosen, P. et al. : J.A.M.A., 147 : 241, 1951.
- 35) 青木正和・寺尾義人 : 胸部疾患, 2 : 544, 昭33.
- 36) 長谷川彌人 : 実験治療, No. 260 : 13, 昭27.
- 37) Paraf, J., Desbordes, J. et al. : Presse Méd., 60 : 474, 1952.
- 38) 三上定清・中沢昭三 他 : 京都府立医大誌, 51 : 48, 昭27.

- 39) Tillett, W.S., Sherry, S. et al. : J. Thoracic Surg., 21 : 325, 1951.
- 40) 浅野友次郎・延島一 他 : 最新医学, 8 : 684, 昭28.
- 41) Limber, C.R., Reiser, H.G. et al. : J.A.M.A., 149 : 816, 1952.
- 42) Roettig, L.C., Reiser, H.G. et al. : Dis. of Chest, 21 : 245, 1952.
- 43) Yates, J.L. & Goodrich, B.E. : Dis. of Chest, 24 : 320, 1953.
- 44) 牧野進・中谷朝之 他 : 結核の臨牀, 3 : 274, 昭30.
- 45) 篠井金吾・三宅有 他 : 胸部外科, 8 : 730, 昭30.
- 46) 鶴田晃夫 : 久留米医学会誌, 20 : 333, 昭32.
- 47) 天沼史 : 日本臨牀結核, 18 : 870, 昭34.
- 48) Wipf, R. : Schweiz. Zs. Tuberk., 15 : 201, 1958.
- 49) Schmoll, E. : Deut. Arch. Klin. Med., 81 : 163, 1904.
- 50) Caldwell, G.T. : J. Infect. Dis., 24 : 81, 1919.
- 51) 貝田勝美・柴田昌数 他 : 肺, 3 : 291, 昭31.
- 52) 松尾公三・大沢義信 : 未発表, 1955.
- 53) 山村好弘・谷淳吉 他 : 結核, 31 : 41, 昭31.
- 54) 大沢義信 : 植物学雑誌, 71 : 386, 昭33.
- 55) 堀沢真澄 : 日本胸部外科学会誌, 6 : 130, 昭33.
- 56) 岩井和弘 : 京大結研紀要, 7 (増) : 164, 昭34.
- 57) Anderson, R.J. : J. Biol. Chem., 74 : 525, 1927.
- 58) 大沢義信 : J. Sci. Hiroshima Univ., Ser. B, 8 : 125, 1958.