

実験的肺空洞形成（山村雄一）

国立療養所刀根山病院 山村 好弘

昭和20年代の前半までは、結核の治療法は全く無いといってもよかった。結核療養所には多数の結核患者が充満し、治療としては健康な人に感染しないように隔離し安静にさせるだけであった。1945年、Waksmanによってストレプトマイシン（SM）が発見され、日本では昭和20年代後半から使用が可能になり、初めて有効な治療が行われるようになった。当時はSM、イソニアジド（INH）、パラアミノサリチル酸塩（PAS）が使用されていたが、それでも空洞を完全に治癒することは困難で、排菌や耐性菌出現の原因になっていた。結核治療の癆は肺空洞であった。動物の肺に実験的に空洞を作ろうとする試みは、いくつか報告されている¹⁾。たとえば、Ratcliffeら²⁾は、経気道感染装置を用いて、兎の肺にウシ型結核菌を噴霧感染させると、あらかじめ結核菌を皮下に注射して感作された兎では6~12カ月後に肺空洞の形成を認めるが、非感作の兎では認めなかった。この実験の欠点は、特殊な感染装置が必要なこと、形成に長期間かかること、形成までの時間や形成率が一定しないことである。この空洞を実験的に確実に形成し、その機序を解明し、治療に結びつけようと試みたのが、山村雄一をリーダーとする刀根山病院の若き医師たちであった。刀根山病院は大阪市立結核療養所の時代から、治療法がなかった結核には研究が第一であるとして、広い研究室があり研究活動も活発であったが、戦争で中断していた。海軍軍医から復員してきた山村は、前線での体験から日本の復興は科学技術の発展以外にないと感じていた。まず大阪大学理学部赤堀研究室で、3年ほど生化学の基礎を勉強した後、結核菌の物質代謝と空洞形成の研究を開始した。

I. 実験的結核肺空洞の定義³⁾⁴⁾

結核の肺空洞とは、結核菌の感染によって形成される肺組織の欠損である。中央に空気の穴があり、それを取り囲んで類上皮細胞とTリンパからなる結核特有の肉芽層が空洞壁を形成し、その外側に繊維組織が取り囲んでいる。壁の内側には、壊死乾酪物質が存在し、誘導気管支を通じて外部と通じている。壊死物質は結核菌の良き

培地となり、外部からの空気の流入は好気性菌である結核菌の増殖に適し菌が多数存在する。これらの菌は、痰、咳によって気管支を通じて外部に排泄され、他人への感染源となり、また管内性転移の原因ともなる。空洞壁の厚い場合は薬剤が浸透しにくく治療に抵抗し、薬剤耐性菌の出現を促す。実験では、このような人間の空洞に見られるような特徴をもつ径5mm以上の空洞を結核性空洞と定義し、それ以外の空洞は除外した。

II. 生菌・死菌による肺空洞形成³⁾⁴⁾

はじめウシ型結核菌Ravenel株の生菌を生理的食塩水0.1mlに懸濁して、兎の左右両肺に胸壁を通じて注射し1~2カ月後に剖見したが、病巣は1カ所に限局せず散らばり、空洞形成は認められなかった。それで、肺病巣を限局させるために、菌を流動パラフィン（流パラ）と脱水ラノリン（脱ラ）混液（2:1）に懸濁して、同上の方法で肺内に注射し一定期間後に屠殺剖見した。この場合ヒト型、ウシ型結核菌の生菌、加熱死菌が用いられた。兎は、あらかじめ結核生菌、死菌を流パラ・脱ラ混液に懸濁して皮下に注射して前感作した兎と、非感作の兎が用いられた。その結果を表1に示す。生菌を肺内注射した場合、前感作兎では1カ月後に全例に空洞形成が認められたが、非感作群では1カ月後に半数以下にしか空洞が認められず、2カ月後も同様であった。驚いたことには、対照として死菌を肺内注射した群にも、前感作してあれば高率に30日後に空洞が形成されたことである。その後、死菌でも注射菌量を増加すれば、時間はか

表1 結核生菌、死菌による兎肺における空洞形成

前感作◇	肺内注射菌◆	注射後の日数	空洞形成率
あり	生菌	30日	4/4
あり	生菌	50-60日	4/4
なし	生菌	30日	1/2
なし	生菌	60日	2/5
あり	死菌	30日	6/14
なし	死菌	30日	0/3

◇: 前感作の方法は、本文記載の方法でなされた。
前感作、および肺内注射菌は、ウシ型結核菌三輪株を使用。
◆: 1mg湿量。

かるが前感作が無くても空洞が形成されることが判明した。感作兎からの免疫血清の移行は、空洞形成に影響を与えなかった。当時は空洞は結核菌が直接肺組織を食い荒らしてできると考えられていたが、この結果から結核菌がある量以上あれば、局所の遅延型過敏症（DTH、または細胞性アレルギー反応）を誘発し、その結果、空洞が形成されると考えられた。生菌が少量でも空洞を形成するのは、増殖して抗原量が増加するためと考えられる。組織学的には、前感作兎のほうが非感作兎に比べて病巣は限局的で小さく、早期に壊死乾酪化が強く出現し、肉芽層も早期に出現し広範であった。

Ⅲ. 菌体成分による空洞形成

(1) 菌体リポ蛋白質（LP）による空洞形成³⁾⁴⁾

結核菌のもつ強いアジュバント（Adj）作用には、菌特有のリピッドの関与が考えられる。Folchの方法でBCG死菌体からLPが抽出された⁵⁾。その3mgを肺内に注射すると、前感作兎では14日後に7分の6の病巣に、0.1mgでも25日後に病巣の3分の2に空洞が形成された。非感作兎では、3mgで25日後に5分の2の病巣に空洞を認めたが、1mg以下では認められなかった。空洞の性状としては、壊死乾酪巣は広範多量で、肉芽層は厚く、周曲炎も強く、形成率も高く、必ずしも前感作を必要とせず、死菌使用の場合と酷似していた（図1）。

(2) 結核蛋白、リピッド各単独による空洞形成

菌体蛋白としては、武谷ら⁶⁾の方法によって結核菌培養濾液より得られた π S蛋白質を、感作兎と、非感作兎の肺内に注射した。結果は、感作兎に注射した場合は30日後に空洞が約半数に形成されたが、壊死乾酪巣は限局性で少なく肉芽層もきわめて薄く周局炎も弱かった。非感作兎では空洞の形成は認めなかった³⁾。またEichberg

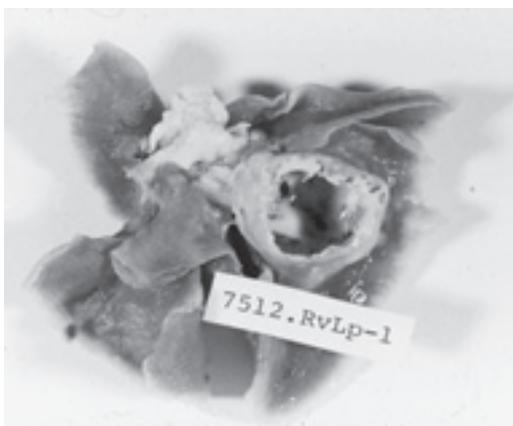


図1 ヒト型加熱死菌H37Rv株のリポ蛋白の注射によって形成された肺空洞

の方法⁷⁾でヒト型結核菌から得られたLPの蛋白部を、非感作兎の肺内に注射したが、同様に空洞形成は認めなかった。菌体リピッドとしては、LPのリピッド部、Cord Factor（CF, trehalose-6, 6'-dimycolate）、燐脂質が使用された。これら3mg乾量を流パラに懸濁して兎の肺内に注射し、6週後に剖見したが、いずれも空洞は認められなかった。この結果から、蛋白質単独では反応源となるが感作力がなく、リピッド単独でも感作力がないため、単独では空洞が形成されないと考えられた（表2）。

(3) 菌体蛋白質と菌体リピッド、または合成Adj物質の混合による空洞形成⁸⁾⁹⁾

リピッドと菌体蛋白とを混合して、その再構成効果が観察された。LPはヒト型菌H37Rv、*M.phlei*の死菌から抽出された。*M.phlei*を使用した理由は収量が多いためである。LPをリピッド部と蛋白部とに分離し、リピッド部と蛋白部を再混合して肺内に注射した。結果は元のLPよりも形成率は悪く空洞壁も薄かったが、空洞形成が認められた。これはリピッド部と蛋白部が混合されているだけで、LPのごとく結合していないためと考えられる。次にミコール酸・アラビノガラクトン・ムコペプタイドの構造をもつBCGのCell wall skeleton（BCG-CWS）、CF、燐脂質、合成AdjのMDP（N-acetylmuramyl dipeptide）、B30-MDP、BH48-MDP、Quinonyl-MDP-66）、L18-MDP 各1.5mgと、H37v、*M.phlei*のリポ蛋白から分離された蛋白部1.5mgを混じて兎の肺内に注射し、6週後に剖見し

表2 ミコバクテリア・リピッド、合成アジュバントとミコバクテリア・蛋白とを混合して注射した場合の空洞形成活性

肺内注射抗原	肺病巣			空洞形成率
	空洞	壊死	肉芽腫	
<u>ミコバクテリア抗原</u>				
I-t♦+II-t◇	3/11	4/11	4/11	27%
BCG-CWS*+II-p#	4/11	0/11	7/11	36
Cord Factor+II-p	3/11	5/11	3/11	27
Phosphide+II-p	0/12	0/12	12/12	0
BCG-CWS	1/11	0/11	10/11	9
Cord Factor	0/12	0/12	12/12	0
I-t	0/8	0/8	8/8	0
II-t	0/8	0/8	8/8	0
II-p	0/8	1/8	7/8	0
<u>合成アジュバント</u>				
BH48-MDP+II-p	2/10	4/10	4/10	20%
B30-MDP+II-p	2/10	2/10	6/10	20
L18-MDP+II-p	0/6	0/6	6/6	0
Quinonyl-MDP-66+II-p	0/8	0/8	8/8	0
MDP+II-p	0/10	1/10	9/10	0
BH48-MDP	0/9	3/9	6/9	0
B30-MDP	0/10	1/10	9/10	0

♦：H37Rv リポ蛋白のリピッド部

◇：H37Rv リポ蛋白の蛋白部

#：M.phlei リポ蛋白の蛋白部

*BCG-CWS：BCGの細胞壁骨格

た。合成Adjの化学構造式は、図2⁷⁾に示す。その結果は表2に示す。分枝脂肪酸を有するCWS, CF, BH48-MDP, B30-MDPと蛋白部を混じて注射した群に空洞形成を認めた。とくにCWS, CFはCの総数が80以上もあるミコール酸を含んでおり、マクロファージ(Mφ)は、これを消化する酵素をもっていない。これに対して、分枝脂肪酸をもたない燐脂質, MDP, L18-MDP, Quinonyl-MDP-66と蛋白部を混じて注射した群では、空洞形成は認められなかった。またCWS, CF, 合成Adjそれぞれ単独では空洞形成は認められなかった。この結果から、空洞形成には結核菌の細胞壁に含まれる長鎖分枝脂肪酸のミコール酸がAdjとして蛋白の抗原性を高め、DTHの誘発に何らかの関与をしていることが考えられた。

IV. 空洞形成阻止

空洞形成には、DTHが主な役割を演じていると考えられ、DTHを阻止する実験が行われた。

(1) ツベルクリン類回注射による脱感作¹⁰⁾

最初は旧ツベルクリンが使用されたが³⁾⁴⁾、後に精製されたTuberculin active peptide (TAP)が使用された。兎に人型結核死菌を肺内に注射し、TAP 2 mgを週3回静脈内投与し6週後に屠殺剖見した。その結果、TAP投与脱感作群では、空洞は認められず肉芽腫のみであったが、対照のTAP非投与群では、50%に空洞を認めた。ツ反応、肺胞Mφ遊送阻止試験はTAP投与群では全例陰性であったが、非投与群ではいずれも陽性であった。結核菌の菌体多糖体であるアラビノガラクトンに対する血清の抗体値は、両群とも大きな差異を認めなかった。

(2) 免疫抑制剤の投与¹¹⁾

1965年頃より臓器移植に対して、免疫抑制剤のAzathioprine (イムラン)が開発されたので、化学療法とイムランの併用効果を観察した。兎を4群に分け、全群にヒ

ト型H37Rv生菌 4 mg湿量を肺内注射した。そして、第1群は無処置とし、第2群はイムランのみ毎日投与、第3群はSM+INHを毎日、第4群はSM+INH+イムランを毎日投与した。40日後に剖見した結果は、表3に示すごとく、第4群のSM+INH+イムラン投与群のみが空洞を形成せず、ツ反応も弱陽性であった。これに対して他の群では、空洞が形成され、ツ反応も陽性であった。この実験では、生菌を注射した場合、初期から化学療法で菌の発育を抑制しても、一定量以上の菌量(抗原量)があればDTHが発生し、空洞が形成されることを示している。

V. 空洞形成の機構

結核の肺空洞形成の機構は次のように考えられる。結核は呼吸器を通して、菌が肺胞に吸い込まれることによって感染は成立する。まず肺の感染場所に滲出性反応が起こり、滲出液と多核白血球が遊出する。しかし多核白血球は血中では数時間の寿命しかなく、複雑な多量のリピッドを含む結核菌は破壊できない。次にMφや樹状細胞が食菌するが、結核菌はMφ内で増殖を続け、Mφ

表3 結核生菌を肺内注射後、空洞形成に及ぼすイムラン、化学療法の効果

処置*	肺病巣の型			ツベルクリン反応
	空洞性	壊死性	肉芽腫性	平均値±標準偏差値 (mm)
無処置	3/6	3/6	0/6	20.0±13.7
イムラン	6/8	1/8	1/8	15.0±4.0
SM+INH	5/9	3/9	1/9	16.3±9.5
SM+INH+イムラン	0/10	3/10	7/10	6.7±7.9

*投与量：イムラン：2 mg/kg 毎日, SM：20 mg/kg 毎日, INH：10 mg/kg 毎日。すべての薬剤は、結核生菌を肺内注射後、40日後に兎を屠殺剖見するまで継続された。

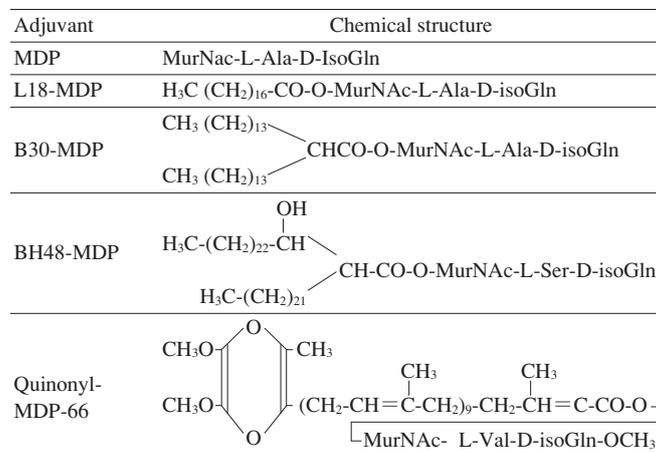


図2 合成アジュバントの化学構造

は破壊される。やがて結核菌の抗原情報がTリンパ球に伝えられ、Tリンパ球からインターロイキン (IL)-12, IL-18, 腫瘍壊死因子- α , インターフェロン- γ 等の各種のサイトカインが放出されると、多数の活性化M ϕ が病巣に集合して盛んに食菌して増殖を阻止し、菌は休眠状態となる。そしてM ϕ 自身は類上皮細胞に変化し、一部は融合してLanghansの巨細胞となり、Tリンパ球と共に病巣を取り囲む肉芽層となり、その外側に繊維組織が形成されて結核腫となる。そしてこの反応が強ければ、病巣部の血行障害、小血管の破綻がおこる。病巣部への酸素の供給不足は組織を嫌气的方向に傾け、乳酸をはじめとする酸性物質を増加させて病巣部のpHを低下させ、ライソゾーム水解酵素の格好の場となる。富野ら¹²⁾は、兔に結核死菌を肺注して空洞を形成させると、結核病巣の蛋白分解酵素活性が、非病巣部よりも数倍高いこと、その活性は病巣の進展とともに増加し、特に結核菌による前感作をした場合は増加が急速である。またPPD類回注射で脱感作をすると、酵素活性が低く抑えられることを認め、その原因は病巣に集合してくるM ϕ のライソゾーム蛋白分解酵素で、至適pH 4.0のCathepsin Bによく似たチオール蛋白分解酵素であることを発見した。この酵素は、病巣部に見いだされるが、非病巣部には見いだされないと述べている。いずれにしても、M ϕ が活性化され、その活発な食菌作用により、自らも破壊されて多量の蛋白分解酵素を放出し、病巣は中心が壊死・乾酪・軟化・融解して誘導気管支から排出され、空洞が形成されると考えられる。この細胞性アレルギー反応には、結核菌特有の長鎖の分鎖脂肪酸であるミコール酸が重要な役割を演じていると考えられるが、詳細な機構は解明されていない。

おわりに

この研究は、昭和20年代の前半に、当時の国立療養所刀根山病院で、山村雄一をリーダーとする研究陣によって開始された。その後先生は、昭和32年に九州大学教授 (医化学)、昭和37年大阪大学教授 (内科学)、昭和54年に大阪大学総長に就任され、昭和60年に退官された。そして、平成2年6月、惜しくも逝去された。刀根山病院在勤中は、直接、空洞形成の実験に参加され、自らも兔に注射された。九州大学への転勤後も、引き続き刀根山病院研究陣を間接的に懇切指導された。結核菌が肺組織を直接破壊して空洞が形成されるのではなく、結核の細胞性アレルギー反応によって形成されることを明らかにされた。しかし、その反応の免疫学的、生化学的な詳細な過程は不明である。現在は、SM, INH, リファンピシン (RFP), エタンブトール (EB) の4つの強力な化学療法剤の併用療法が行われ、初期にさえ十分な治療をす

れば、大部分は空洞を形成することなく、またたとえ空洞が形成されても治癒するようになった。しかし治療に失敗した壁の厚い空洞は、化学療法でも治癒しがたく、現在でも外科的切除が行われている。岩崎¹³⁾は、後期エイズ患者では肺野に空洞が認められないことを報告し、CD4陽性Tリンパ球が破壊されて細胞性アレルギー反応が弱くなり空洞が形成されないと述べている。この事実は山村の説を裏付けるものと考えられる。この研究で、昭和34年、朝日賞を受賞された。

この研究に参加された人の中で、その全容を把握しているのは私だけとなったので、ここに拙文を記載する。

最後にこの研究に、試料と助言を頂いた東市郎、金綱史至氏に心よりお礼を申しあげる。

文 献

- 1) Helke KL, Mankowski JL, Manabe YC: Animal models of cavitation in pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis (Review)*. 2006; 86: 337-348.
- 2) Ratcliffe HL, Wells WF: Tuberculosis of rabbits induced by droplet nuclei infection. I. Initial response to infection. II. Response to reinfection. *J Exp Med*. 1948; 87: 545-584.
- 3) 山村雄一, 中村 滋, 八坂 茂: 「結核のアレルギー」第1版. 医学書院, 東京, 1956, 107-172.
- 4) Yamamura Y: The pathogenesis of tuberculous cavities. In: *Advances in tuberculosis research*, Vol. IX, 1st ed, Birkhauser H, Bloch H, Canetti, G, ed. S. Karger., Basel, New York, 1958, 13-37.
- 5) Folch J, Lees M: Proteolipides, a new type of tissue proteins. *J Biol Chem*. 1951; 191: 807-817.
- 6) Takeya K, Jinnaka Y: A new purification method of tuberculin protein. *Enzymologia*. 1956; 17: 378-382.
- 7) Eichberg J: Isolation and partial characterization of beef heart proteolipid. *Biochim Biophys Acta*. 1969; 187: 533.
- 8) Maeda H, Yamamura Y, Ogawa Y, et al.: Mycobacterial antigens relating to experimental pulmonary cavity formation. *Amer Rev Respir*. 1977; 115: 617-623.
- 9) Yamamura Y, Maeda H, Ogawa Y, et al.: Experimental pulmonary cavity formation by mycobacterial components and synthetic adjuvants. *Microbiol Immunol*. 1986; 30: 1175-1187.
- 10) Yamamura Y, Ogawa O, Maeda H, et al.: Prevention of tuberculous cavity formation by desensitization with Tuberculin-Active Peptide. *Amer Rev Respir Dis*. 1974; 109: 594-601.
- 11) Yamamura Y, Ogawa Y, Yamagata H, et al.: Prevention of tuberculous cavity formation by immunosuppressive drugs. *Amer Rev Respir Dis*. 1968; 98: 720-723.
- 12) 富野郁子, 山村好弘, 前田秀夫, 他: 実験的結核病巣における蛋白分解酵素の研究. *結核*. 1979; 54: 399-405.
- 13) 岩崎龍郎: 「新・結核の病理」. JATAブックスNo.3, 初版, 結核予防会, 東京, 1994, 74-78.