

# 実験的肺アスペルギルス症の病理組織学的研究

小 林 一 夫

信州大学医学部第2病理学教室  
(指導: 発地雅夫教授)

## Histopathological Studies on Experimental Pulmonary Aspergillosis

Kazuo KOBAYASHI

Department of Pathology, Shinshu University School of Medicine  
(Director: Prof. Masao HOTCHI)

The present studies were performed to analyse and compare the pulmonary initial lesions induced by an intratracheal inoculation of  $10^8$  live spores of *Aspergillus fumigatus* into rabbits in various conditions. The results were summarized as follows: 1) the initial tissue response in the healthy control animals was done chiefly by polymorphonuclear leukocytes (PMN), but a few days later changed to granulomatous reaction; 2) in the animals sensitized intravenously to formalin-killed *A. fumigatus* cells, the serum antibody against the cells was obtained and more extensive PMN infiltration at the initial stage (which may correspond to Arthus phenomenon) was observed; 3) in the animals sensitized intratracheally to formalin-killed *A. fumigatus* cells, the serum antibody was also obtained and alveolar macrophages were already activated by the sensitization, so that the inoculated live spores were almost eliminated by the activated macrophages even at the initial stage; 4) in the animals sensitized non-specifically to bovine serum albumin, the tissue responses were not different from those of the control animals; 5) the animals compromised to Cyclophosphamide and Mitomycin C revealed extensive necrotic lesions about 2 days after inoculation and the lesions expanded progressively with abundant hyphal growth of the inoculated spores.

In conclusion, it is emphasized that PMN play an important role in the initial elimination of *A. fumigatus* spores in the lung, and the activated alveolar macrophages then contribute to eliminate the still untreated spores and their preserved components undigested by PMN in the lesions. *Shinshu Med. J.*, 32: 43-61, 1984

(Received for publication October 12, 1983)

**Key words:** *Aspergillus fumigatus*, invasive aspergillosis, allergic aspergillosis, granuloma, alveolar macrophage

侵襲性アスペルギルス症, アレルギー性アスペルギルス症, 肉芽腫, 肺胞マクロファージ

### I 緒 言

深在性真菌症は近年著しい増加傾向を示している。アスペルギルス症は、その約23%を占め<sup>1)</sup>、ほとんどが肺病変を形成する。肺アスペルギルス症は真菌症の中でも比較的多様な病態を示し、侵襲性肺炎型、限局

性菌球型、アレルギー型ならびにその他に分類される<sup>2)</sup>。その約96%は続発性であり<sup>1)</sup>、アスペルギルス自体の病原性や毒性よりも、宿主側の感染防御能が疾患の発生に大きな影響を与えていることを示している。肺アスペルギルス症の研究は、各種の抗生物質、ステロイド剤および抗癌剤などの投与により生体の防御能

を低下させることによって発症させる実験や、さまざまな免疫学的検索も行われてきた<sup>3)-6)</sup>。今回、著者は、肺内に接種されたアスペルギルス菌体がいかなる個体条件においてどのように排除されるのか、またそのような個体が、感染初期においてどのように反応するかを組織学的に観察するため、家兎を用いて各種環境下における実験を行った。

## II 材料と方法

### A 材 料

- 1 実験動物：体重約3kgの白色家兎を用いた。
- 2 使用菌株：東京大学医科学研究所保存株、*Aspergillus fumigatus* I-7CZ (IAM-2004) を Sabouraud dextrose 寒天培地にて、37°C、4日間培養し、0.1%の Tween 80 アルコールを含む滅菌生理的食塩水にて胞子浮遊液を作製した。
- 3 感作原：上記菌株を Czapek-Dox 液体培地にて、37°C、4日間振盪培養した菌体を1%ホルマリン殺菌し、ガラスホモジナイザーで破碎した後、1,500 rpm にて30分遠心沈殿を行い、沈渣を生理的食塩水に再浮遊させ、光電比色計 (630nm) で McFarland No. 97) の濁度に調整して使用した。
- 4 沈降原：上記菌株を同じく Czapek-Dox 液体培地にて、37°C、4日間振盪培養した菌体から、Westphal の変法により多糖体成分を抽出し、生理的食塩水にて 100μg/ml の濃度に調整して使用した<sup>8)</sup>。

### B 方 法

1 アレルギーの診断用アスペルギルスアレルゲン (鳥居薬品) および作製したアスペルギルス沈降原に対して陰性の家兎を用い、対照群、経静脈感作群、経気道感作群、牛血清アルブミン (BSA) 気道感作群、抗癌剤投与群の各群に分け、おのおのの群に次のような処置を施した。

- a 経静脈感作群：感作原を4日おきに、0.5, 1, 2, 4 ml と逐次増量静注し、最終免疫より10日後に試験採血を行い、重層沈降反応<sup>9)</sup>により血清中の抗体価が16倍以上を示した家兎を以後の実験に使用した。
- b 経気道感作群：感作原を1日おきに1ml ずつ10回気管から注入し、最終投与より10日後に試験採血を行い、重層沈降反応にて抗体価を測定した。
- c BSA気道感作群：菌体に対する経気道感作群の対照として、BSA (Sigma, Lot. 12F-9370) の1%生食溶液を1日おきに1ml ずつ気道内に10回注入した家兎を用いた。

d 抗癌剤投与群：Cyclophosphamide (25mg/kg) と Mitomycin C (0.25mg/kg) を連日、2週間静注し、末梢白血球数が処置前の約半数以下になった家兎を用いた。

2 各群の家兎について、上述の処置を施した後、右肺に到達するように気管内へ約10<sup>8</sup>個の胞子浮遊液を接種した。接種後、6時間、12時間、1, 2, 4および8日に屠殺した。両肺および腎を無菌的に摘出し、その断面を Sabouraud dextrose 寒天培地に塗布しそれぞれ真菌の培養 (37°C, 7日間) を行った。また、肺、腎、肝、脾、心の各組織を2%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液にて固定し、hematoxylin-eosin (HE), periodic acid Schiff (PAS), Grocott の methenamine silver (Grocott) および渡辺の鍍銀の各染色を行った。一方、走査型電子顕微鏡 (SEM) および透過型電子顕微鏡による検索のため、冷却した3%グルタルアルデヒドリン酸緩衝液 (pH 7.4, 0.1M) で1時間固定し、さらに1%オスミウム酸リン酸緩衝液 (pH 7.4, 0.1M) で1時間後固定を行った。SEM 材料は型通りに脱水した後、有機溶媒凍結割断法<sup>9)</sup>で割断面を作り、臨界点乾燥 (日立 HCP-1 型)、白金—炭素蒸着を行い、日本電子 JSM-S1 型走査電子顕微鏡 (15KV, 70μA) で観察した。透過型電子顕微鏡材料も型通り脱水、Epon 包埋し、超薄切後酢酸ウラン—クエン酸鉛で重染色を行い、日立 HU-11A 型電子顕微鏡 (75KV, 15mA) で観察した。

3 各群の一部家兎については、肺泡マクロファージの機能を検索する目的で、屠殺直後の気道内にチューブを挿入し、Myrvik ら<sup>10)</sup>の肺洗浄法により肺泡マクロファージを採取し、洗浄後、遊走能と殺菌能を検索した。遊走能は、pore size 6μ のミリポアフィルター (Millipore Filter Co.) を用い、遊走因子は Horwitz と Garrett<sup>11)</sup>の方法によって得た *Escherichia coli* K-12 の濾過液を用いる chamber 法<sup>12)</sup>にて検索した。マクロファージを37°C、3時間遊走させた後固定し、hematoxylin 染色後、光学顕微鏡 (400倍) にてフィルター上面と下面の1視野 (0.38 mm<sup>2</sup>) のマクロファージ数を数えた。これを10視野について行い、(下面に遊走した細胞数) / (上面の細胞数) をもって遊走能と判定した<sup>12)</sup>。また同細胞の殺菌能を検索するため、Park ら<sup>13)</sup>の方法によりマクロファージの nitroblue tetrazolium 還元能試験 (NBT) を行い、chamber slide の 0.38mm<sup>2</sup> に付着したマクロファージ数とホルムアザン陽性のマクロファージ

の比を取り、殺菌能とした<sup>14)</sup>。

照群の肺では、孢子接種後6, 12時間後はアスペルギルスがすべて検出されたが、1日以後経時的に陽性率

### III 結 果

#### A 皮内反应

経静脈，経気道両感作群の家兎に診断用アスペルギルスアレルギー（1：10,000），0.02ml を用いて皮内反応を行ったが，接種30分後および24時間後においても有意な反応は認められなかった。僅かに反応した部分の組織像は，真皮の軽い浮腫と多形核白血球浸潤を認めたのみであった。

### B 血清抗体価

経静脈，経気道感作群では，感作後に Fig. 1 に示すごとく沈降抗体価が認められた。特に経静脈感作群において沈降抗体価の推移をみると，生菌接種後に低下していた。また，対照群と BSA 気道感作群では，生菌を接種しても抗体は認められず，菌体による感作原と BSA との間には交叉反応はなかった。

### C 肺および腎における真菌の培養結果

すべての群で腎からは真菌は検出されなかった。対

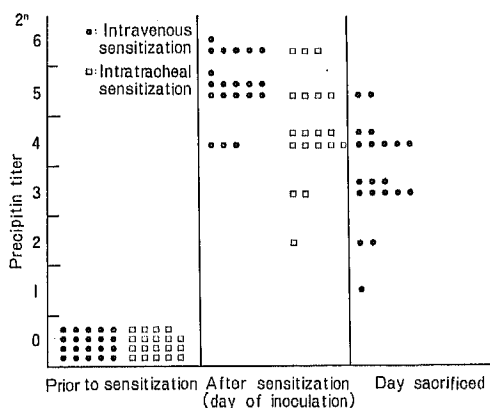


Fig. 1 Precipitin titers of antiserum against crude polysaccharide (100 $\mu$ g/ml) extracted from *Aspergillus fumigatus*.

Table 1 Culture study at autopsy of animals

Group	Days after inoculation	Positive cultures	
		Lung	Kidney
Control	1/4	2/2	0/2
	1/2	2/2	0/2
	1	3/5	0/5
	2	3/4	0/4
	4	2/5	0/5
	8	1/4	0/4
Intravenous sensitization	1/2	1/1	0/1
	1	5/5	0/5
	2	4/5	0/5
	4	3/5	0/5
	8	2/4	0/4
Intratracheal sensitization (*)	1/4	2/2	0/2
	1/2	2/2	0/2
	1	0/4	0/4
	2	0/5	0/5
	4	0/2	0/2
	8	1/4	0/4
Drug-treated (*)	1	5/6	0/6
	2	7/7	0/7
	4	4/6	0/6
	8	3/5	0/5

 $\chi^2$  test. (\*) :  $P < 0.05$ 

Each denominator and numerator shows the number of rabbits.

が漸減した。経静脈感作群の肺では、対照群とほぼ同じ経過を示した。経気道感作群は、6, 12時間の時点では、同様にすべてアスペルギルスが検出されたが、1日以後急激に陰性となった。抗癌剤投与群では、8日後にもほとんどが陽性を示した。統計的に、対照群と経気道感作群および抗癌剤群との間には有意な差が認められた (Table 1)。

## D 組織学的所見

### 1 対照群

a 胞子接種6時間後：アスペルギルス胞子が気管支から細気管支の粘膜面にみられた (Fig. 2)。細気管支内には剝離した上皮細胞や少数のマクロファージが存在し、伴走している血管周囲には多形核白血球が多数認められた。肺胞中隔には軽い浮腫がみられ、肺胞内にも少数のマクロファージが認められた (Fig. 3)。

b 12時間後：細気管支内に剝離した上皮細胞、多数の多形核白血球や胞子が見られ、終末細気管支から肺胞にかけて胞子を囲みながら多形核白血球とマクロファージが浸潤し、細葉単位の小病巣が形成されていた (Fig. 4)。

c 1日後：胞子を囲む多形核白血球の浸潤が強くなり、病巣はやや拡大し、肺胞中隔にも多形核白血球やマクロファージの浸潤が認められた。しかし、病巣内で胞子の破壊や組織の壊死さらに線維素の滲出などは認められなかった (Fig. 5)。

d 2日後：1日までは散在していた小病巣が互いに融合し広範な病巣を形成した。肺胞には強い多形核白血球の浸潤が認められ、一部の肺胞上皮は剝離して肺胞構造は不明瞭となったが、肺胞中隔の好銀線維には断裂や消失は認められなかった (Fig. 6)。電顕的には多形核白血球が胞子を貪食して phagolysosome を形成しており、胞子表面に電子密度の高い物質が認められた (Fig. 7)。

e 4日後：広範な病巣の中心部が凝固壊死に陥り、これを細胞質の淡明化したマクロファージや多核巨細胞が取り囲み、僅かなリンパ球も交えて肉芽腫性病巣を形成していた (Fig. 8)。ところによっては、アスペルギルスの胞子を囲んだいわゆる星芒体が観察されたが、星芒体の周囲は常に多数の多形核白血球から成っていた。一方、マクロファージや多核巨細胞の細胞質には、Grocott や PAS 染色に陽性の粗大顆粒状物が見られ、胞子の破片と考えられた。電顕的には、表面に電子密度の高い物質を持つすでに部分的に破壊された胞子が多核巨細胞に貪食されている像が観察された

(Fig. 9)。

f 8日後：この時期になると病巣は縮小し、いまだ多形核白血球浸潤や壊死が主体の病巣も残存していたが、大部分はむしろマクロファージの小集団からなる肉芽腫性病巣であった。また、完全な形をした胞子はなくマクロファージや多核巨細胞内に顆粒状物として存在していたが、これらマクロファージの類上皮細胞化は認められなかった。一方、肉芽腫性病巣内には、細気管支の再生像も認められた (Fig. 10)。

### 2 経静脈感作群

a 胞子接種12時間後：対照群と同様に、細気管支内には上皮細胞の剝離や多形核白血球の浸潤がみられ、胞子はすでに終末細気管支から肺胞にまで達していた。この胞子を囲んで多形核白血球やマクロファージの浸潤がみられ、細葉単位の小病巣が形成されていたが、多形核白血球の浸潤は対照群と比べると強かった (Fig. 11)。

b 1日後：細気管支内には多形核白血球やマクロファージが充満し、周囲のリンパ濾胞は腫大していた。胞子を囲んで多形核白血球の浸潤が強く、病巣はさらに拡大していた。しかし胞子の破壊や組織の壊死ならびに線維素の滲出は認められなかった。

c 2日後：散在性であった小病巣が融合して大きな病巣を形成し、その大半が多形核白血球の集簇からなっていた (Fig. 12)。この集簇部では、胞子の貪食が著しく、胞子の破片や星芒体の形成が多数認められ、また凝固壊死部も見出された (Fig. 13, 14)。一方、肺胞上皮細胞は圧排されたり剝離し、肺胞中隔の好銀線維も走行が乱れ構造が不明瞭となった。

d 4日後：広汎な病巣では多形核白血球集簇部の壊死が一段と強くなり、その周辺に明るい細胞質のマクロファージと多核巨細胞が出現し、Grocott や PAS 染色陽性の顆粒物が見られる一方、胞子の形を保ったままのものも多核巨細胞内に認められた。また、血清抗体価が16倍の家兎3羽について生菌接種後の組織像を検索したところ、抗体価が32倍以上の家兎よりも多形核白血球の反応が弱く、対照群とほぼ同様な像を示した。

e 8日後：やや病巣が縮小し始めたが、壊死巣を囲むマクロファージや多核巨細胞と少数の多形核白血球からなる肉芽腫性病巣が残り、これは対照群より広汎であった (Fig. 15)。肺胞構造も病巣の消退とともに修復され始めたが、好銀線維は破壊されていた (Fig. 16)。

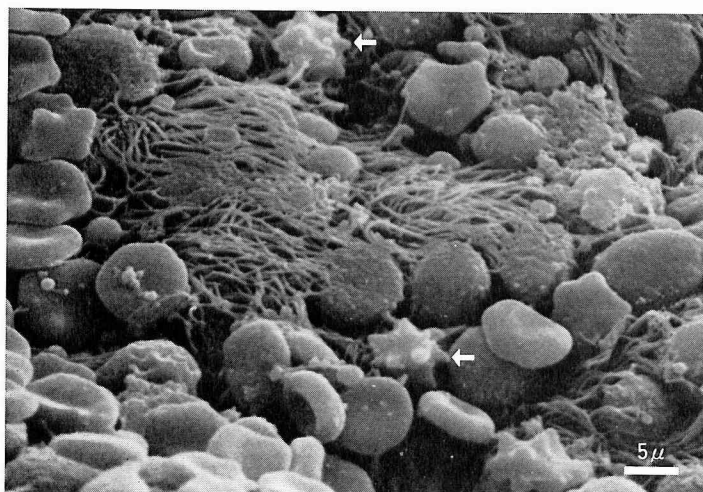


Fig. 2 Scanning electron micrograph of spores (arrows) on the bronchus with red blood cells (6 hours after, control animal).  $\times 3,000$

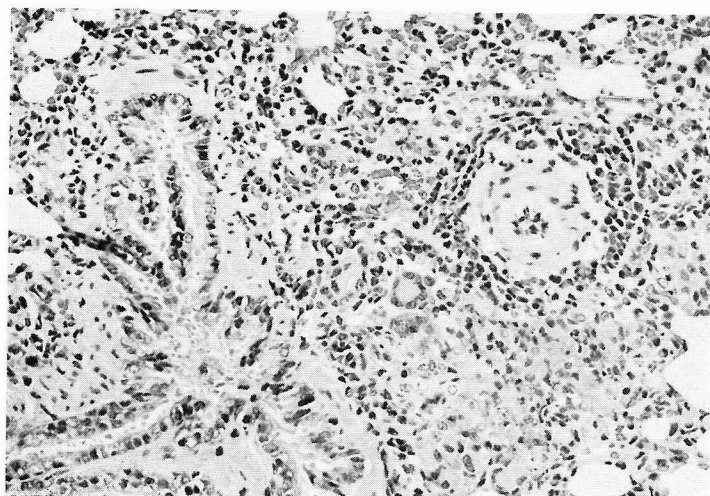


Fig. 3 Early lesion surrounding the terminal bronchioles showing a small amount of macrophages and perivascular leukocytes (6 hours after, control animal). H.E.  $\times 66$

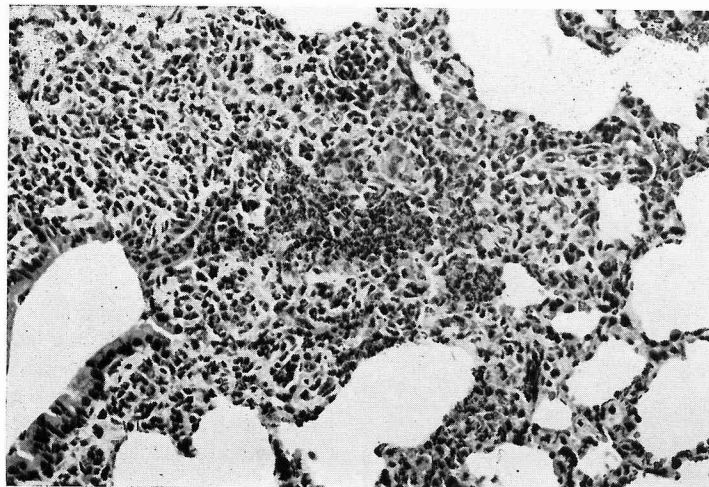


Fig. 4 Minute lesion composed of a few spores, PMN and macrophages (12 hours after, control animal). H.E.  $\times 66$

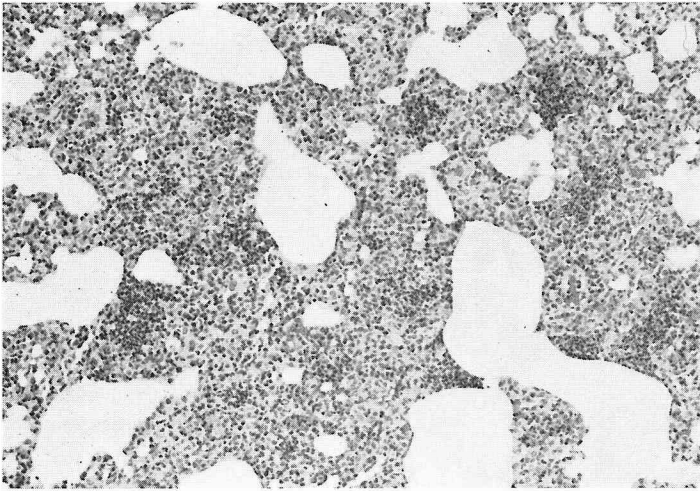


Fig. 5 Confluence and spreading of the same lesions as Fig. 4. (1 day after, control animal). H. E.  $\times 40$

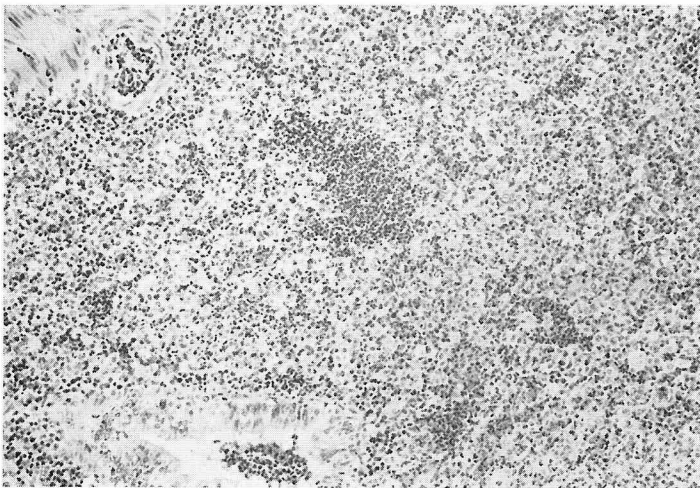


Fig. 6 Widely distributed lesion consisting of extensive leukocytic infiltration (2 days after, control animal). H. E.  $\times 40$

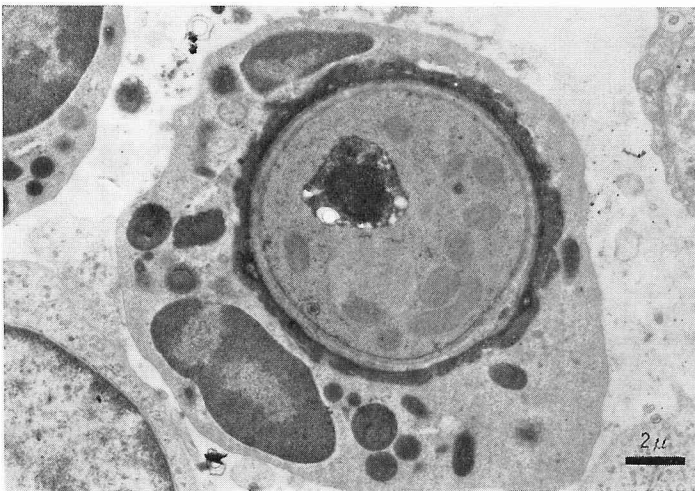


Fig. 7 Electron micrograph of a spore phagocytized in a leukocyte, showing an electron dense layer on the surface of the spore (2 days after, control animal).  $\times 5,000$



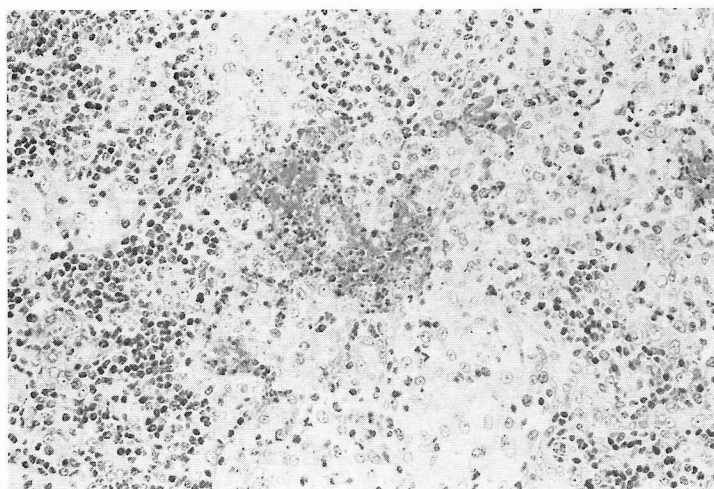


Fig. 8 Granulomatous lesion surrounding necrotic area, consisting of mature macrophages and multinucleated giant cells (4 days after, control animal). H.E.  $\times 66$

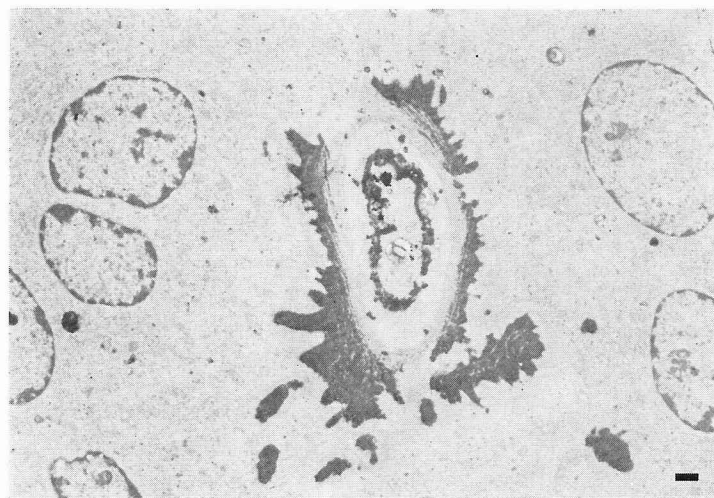


Fig. 9 Electron micrograph of a multinucleated giant cell engulfing an already partially destroyed spore with high electron dense layer on the surface (4 days after, control animal).  $\times 1,800$

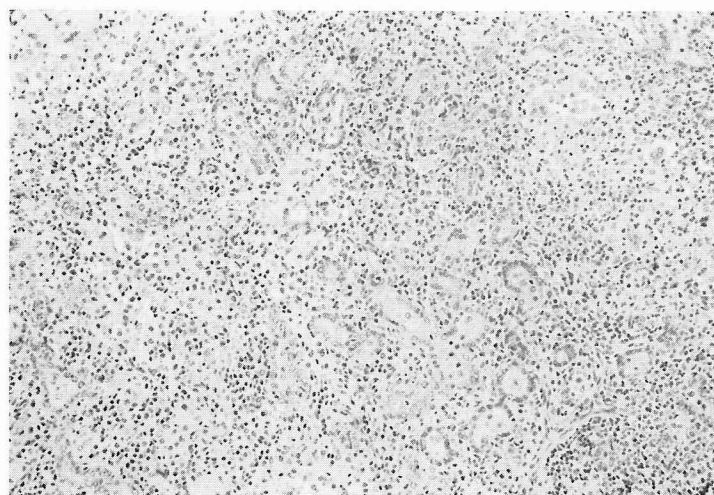


Fig. 10 Reduced lesion consisting of small foci of macrophages and scattered lymphocytes and regenerated bronchioles (8 days after, control animal). H.E.  $\times 40$

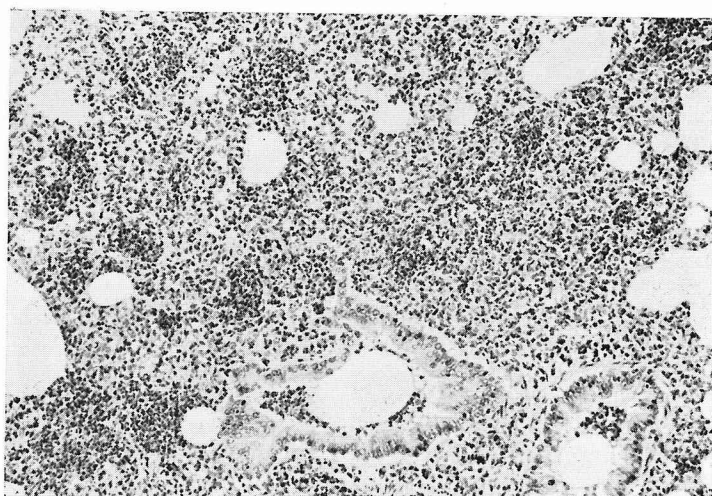


Fig. 11 Confluent small lesions consisting of PMN (12 hours after, intravenously sensitized animal). The lesions were more extensive than those of control animals at this time. H.E.  $\times 40$

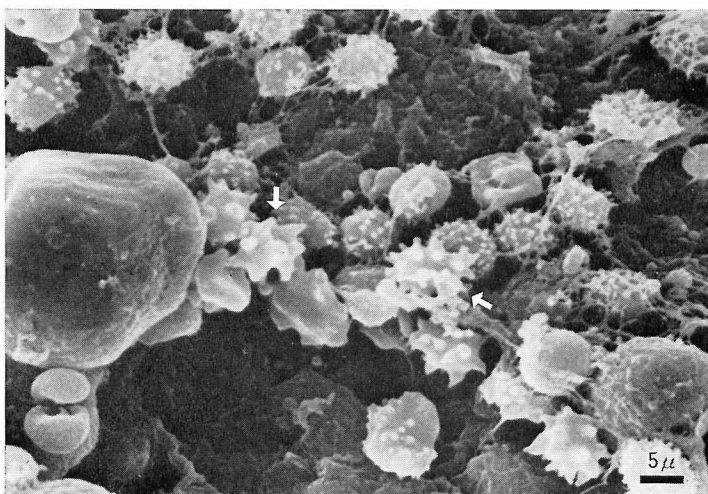


Fig. 12 Scanning electron micrograph of PMN surrounding inoculated spores (arrows) in the alveolus (2 days after, intravenously sensitized animal).  $\times 3,000$

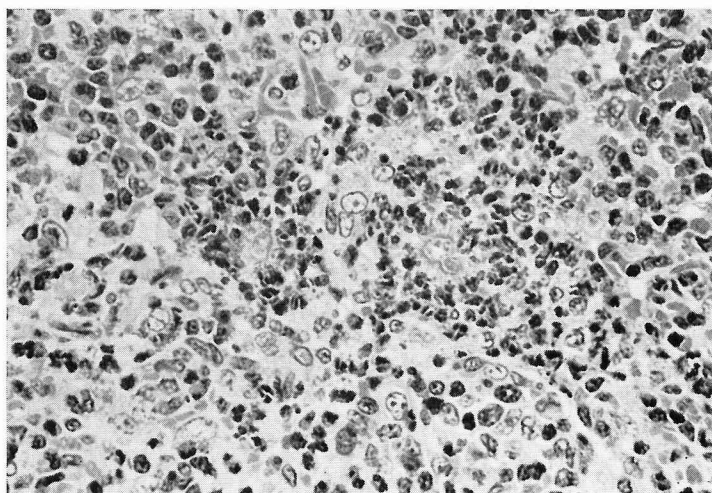


Fig. 13 An asteroid structure of spore surrounded by PMN and purulent lesion (2 days after, intravenously sensitized animal). H.E.  $\times 100$



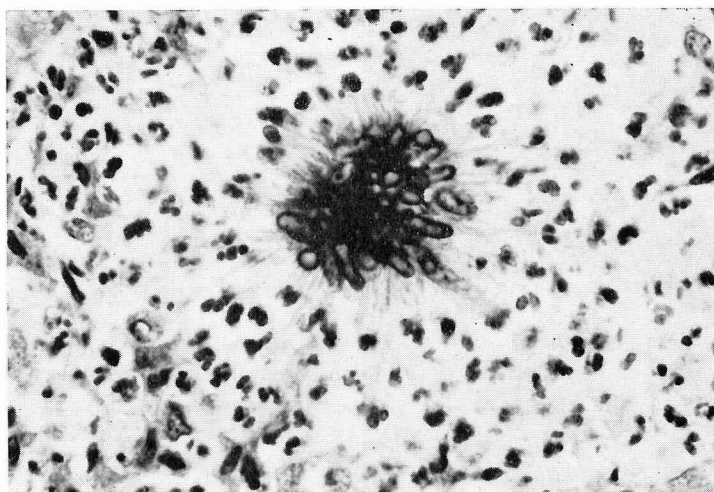


Fig. 14 Typical asteroid structure of the spores (2 days after, intravenously sensitized animal). PAS  $\times 200$

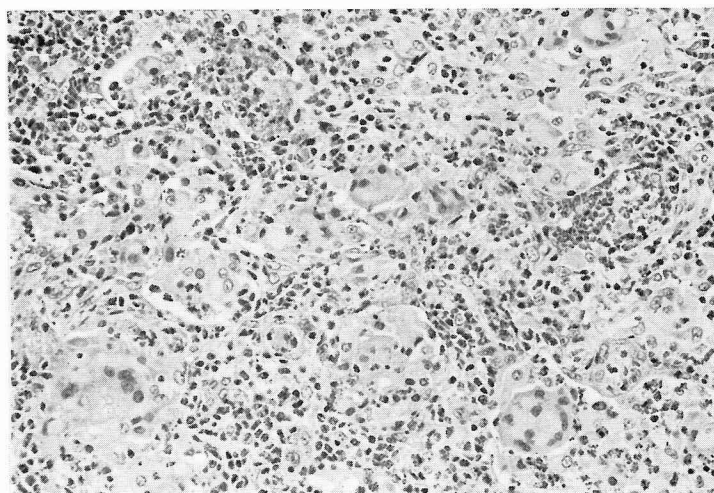


Fig. 15 Scattered granulomatous lesions (8 days after, intravenously sensitized animal). H.E.  $\times 66$

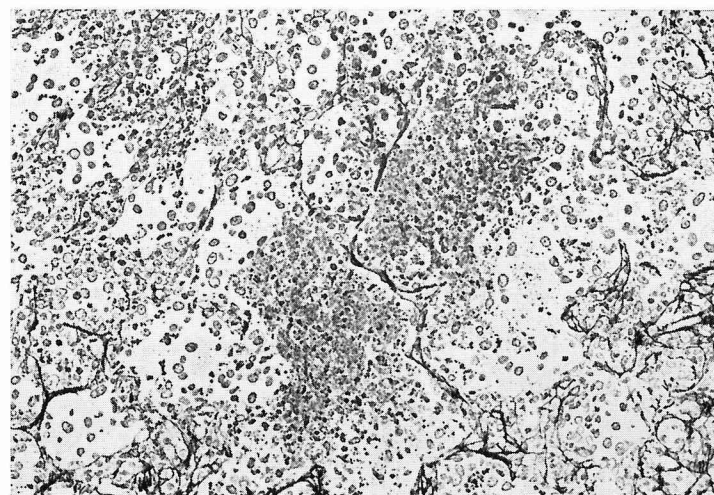


Fig. 16 Partially destroyed reticulin fibers in the alveolar septa (8 days after, intravenously sensitized animal). Silver impregnation  $\times 50$

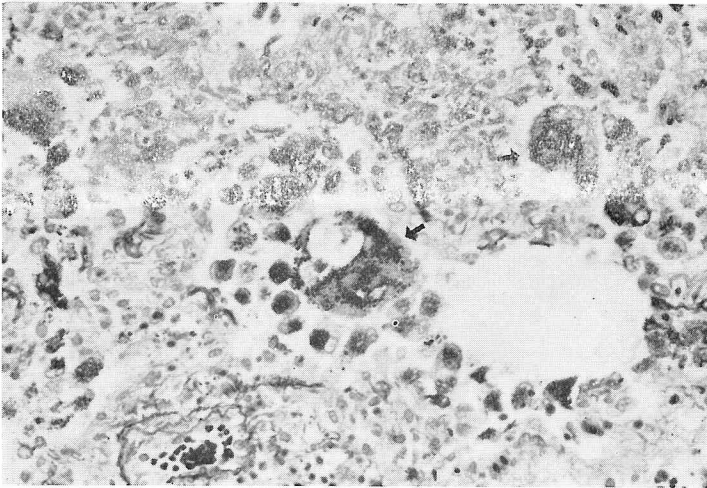


Fig. 17 Alveolar macrophages containing Grocott - positive substances in cytoplasm (after intratracheal sensitization). Grocott  $\times 100$

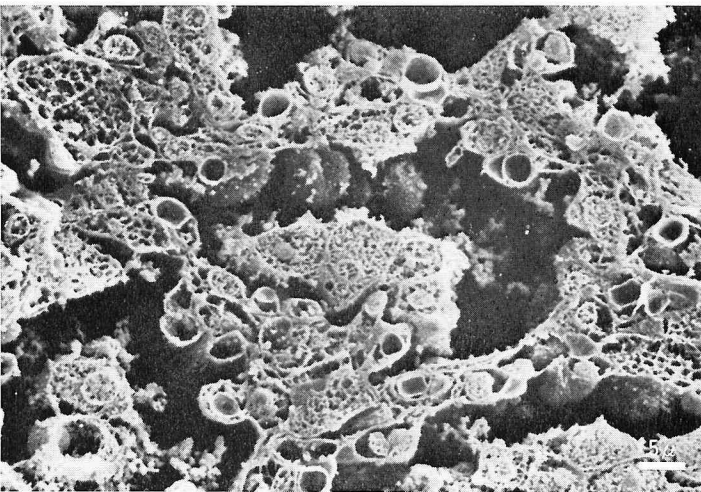


Fig. 18 Scanning electron micrograph of alveolar macrophages in the alveoli (after intratracheal sensitization).  $\times 1,000$

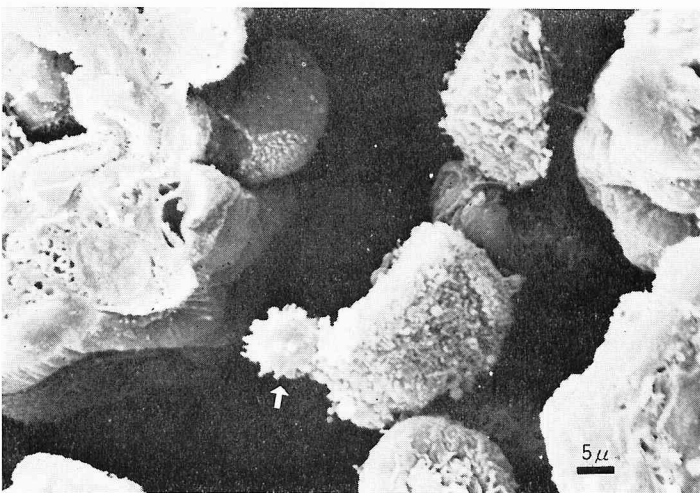


Fig. 19 Scanning electron micrograph showing contact of macrophage to spore (arrow) (12 hours after, intratracheally sensitized animal).  $\times 3,000$

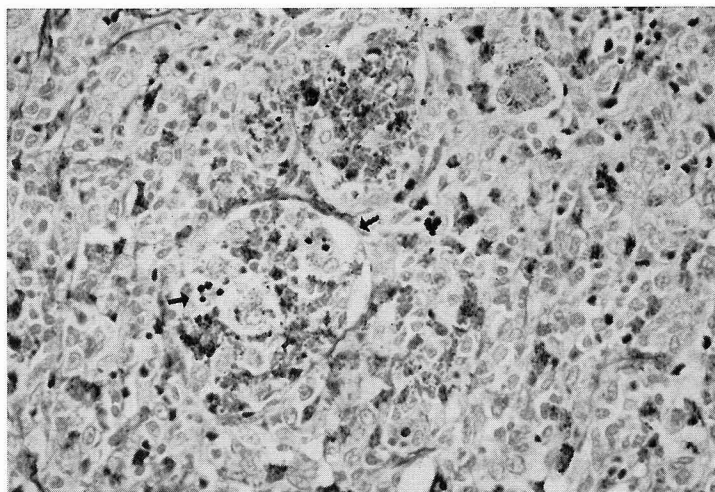


Fig. 20 Spores engulfed in macrophages and their degraded substances. (1 day after, intratracheally sensitized animal). Grocott  $\times 50$

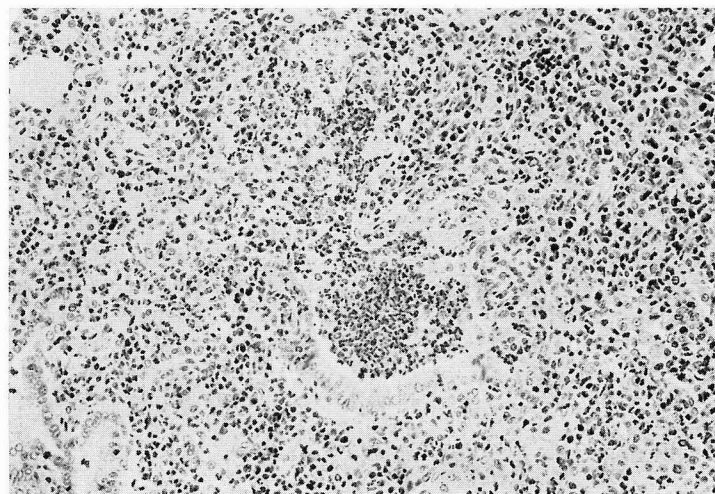


Fig. 21 Leukocytic infiltration in the bronchiole surrounded by granulomatous foci (2 days after, intratracheally sensitized animal). H.E.  $\times 66$

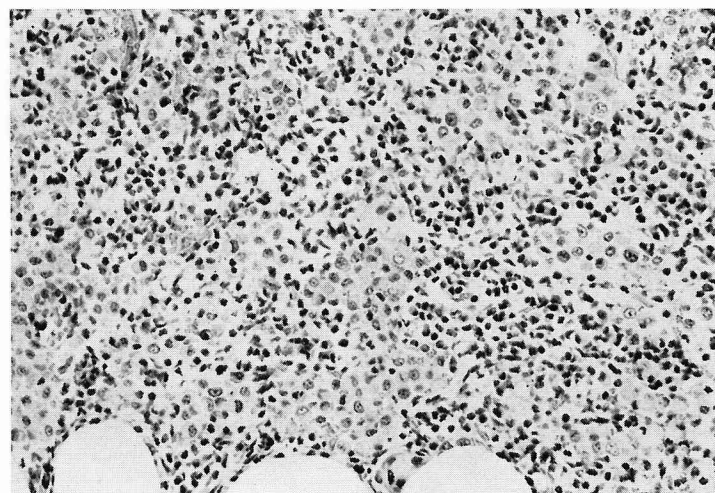


Fig. 22 Reduced lesion consisting of scattered macrophages and leukocytes (4 days after, intratracheally sensitized animal). H.E.  $\times 66$

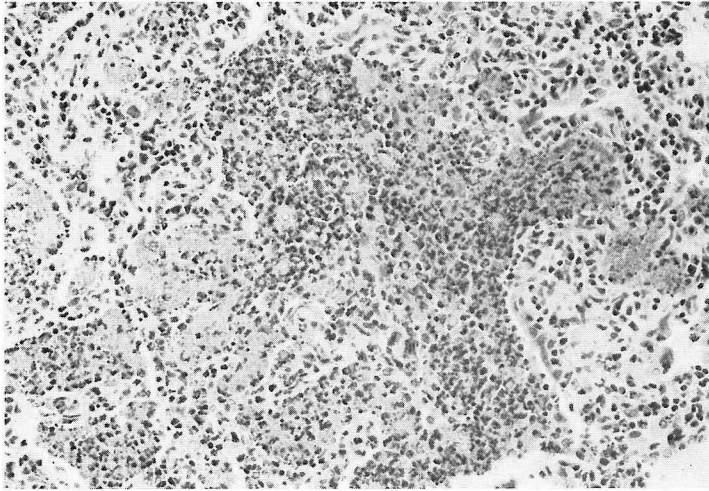


Fig. 23 Extensive necrotic lesion including spores (2 days after, compromised animal). H. E.  $\times 66$

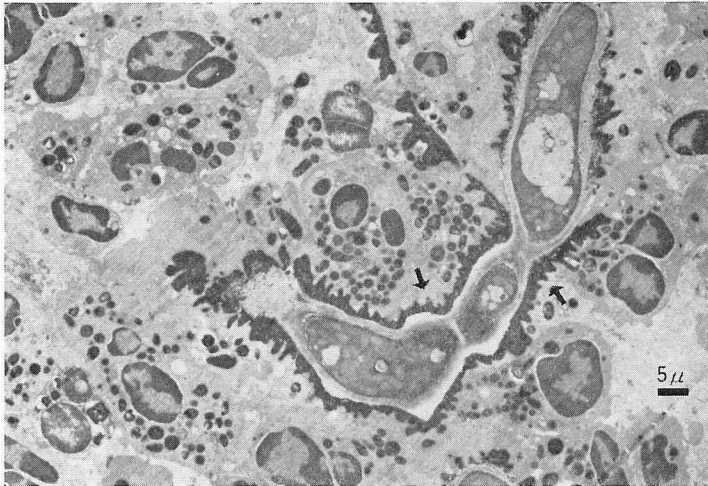


Fig. 24 Electron micrograph of hyphal form surrounded by several leukocytes. Note high electron dense substances (arrows) on the surface of the hypha (2 days after, compromised animal).  $\times 1,300$

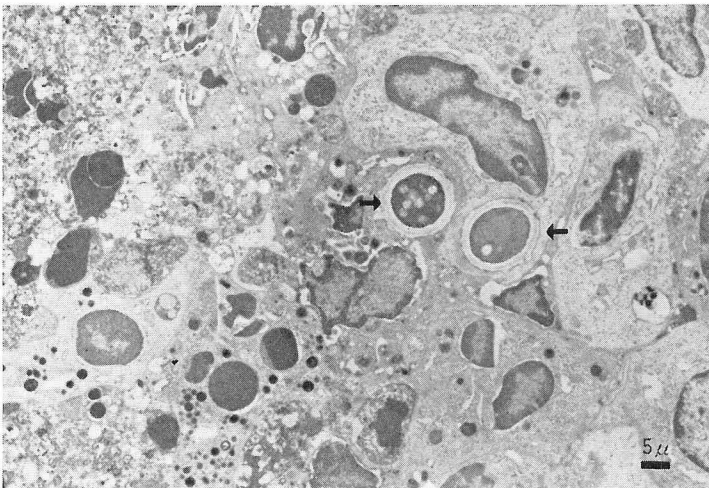


Fig. 25 Electron micrograph of two spores (arrows) without high electron dense layer engulfed in macrophages (2 days after, compromised animal).  $\times 1,300$



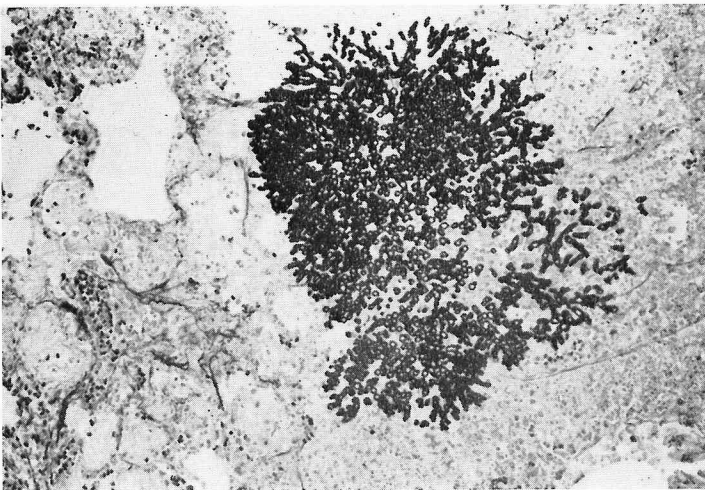


Fig. 26 Radiated hyphal growth in the expanded necrotic lesion (8 days after, compromised animal). Grocott  $\times 100$

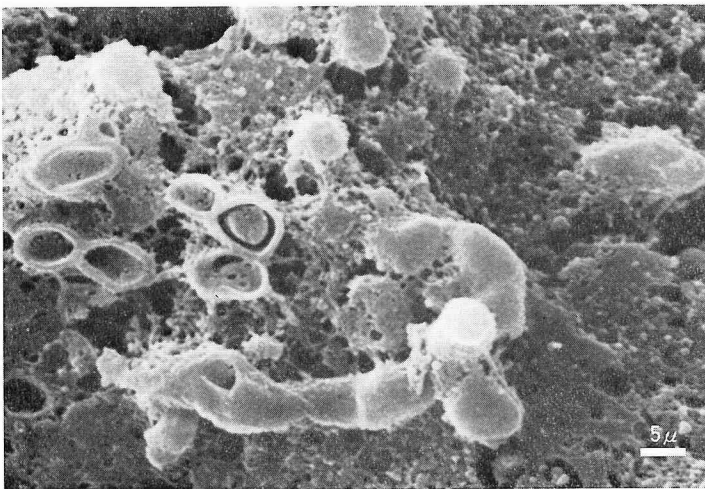


Fig. 27 Scanning electron micrograph of the same hyphae as those in Fig. 26.  $\times 1,300$

### 3 経気道感作群

a 感作による肺所見：感作原を気道内に投与した肺では、細気管支の上皮細胞が腫大し、配列が不規則となり少数の多形核白血球やリンパ球が浸潤していた。細気管支周囲のリンパ濾胞も著しく腫大していた。その細気管支末梢の肺胞内には、少数の多形核白血球を含むマクロファージと多核巨細胞が充満していた。マクロファージ内には、Grocott や PAS 染色にてそれぞれ陽性に染まる微細な顆粒物が大量に含まれていた (Fig. 17)。これらのマクロファージには、電顕的に phagocytic vacuole や residual body が多数見られ、細胞質は網状となり、表面は filopodia 状を呈していた (Fig. 18)。

このような状態にある家兎の肺に、生菌孢子浮遊液

を接種した。

b 接種 6 時間後：感作終了時とほぼ同様な像を示した。

c 12 時間後：終末細気管支から肺胞にかけて、感作終了時の所見に加えて多形核白血球とマクロファージの浸潤があり、孢子を囲む小病巣が認められた。この時期には、孢子はまだ大部分完全な形を保っていた (Fig. 19)。

d 1 日後：多形核白血球とマクロファージの小病巣への浸潤が持続し、小病巣内では、すでに凝固壊死巣がみられた。また、マクロファージの細胞質内には、貪食された孢子や Grocott 染色陽性の粗大な顆粒が多数認められた (Fig. 20)。

e 2 日後：多形核白血球を混在するマクロファージ

ジを主体とした小病巣が互いに融合、拡大し肺胞構造は不明瞭となったが、壊死巣の大きさは変わらず、肺胞中隔の好銀線維の乱れや断裂は認められなかった (Fig. 21)。

f 4日後：病巣内の多形核白血球はほとんどみられなくなり、マクロファージや多核巨細胞、少数のリンパ球および凝固壊死巣が観察され、病巣自体は消退し始めた (Fig. 22)。また、経静脈感作群においてしばしば見られた星芒体は、この群ではほとんど認められなかった。

g 8日後：病巣はおおむね吸収され、マクロファージと少数のリンパ球が気管支や細気管支の周辺に見られ、壊死巣は消失していた。肺胞中隔の好銀線維の構造は、よく保たれていた。

#### 4 BSA による気道感作群

a BSA 感作による肺所見：BSA に対する血清抗体は得られたが、細気管支から肺胞にかけて少数のマクロファージが認められたのみで、アスペルギルスから作製した感作原により感作した肺所見に比べて細胞反応はきわめて少なかった。

b 上記の状態の家兎肺内へ生菌胞子の浮遊液を接種したが、病巣の推移は対照群とほぼ同様であった。

#### 5 抗癌剤投与群

a 接種1日後：肺胞内にはすでに胞子が認められたが細胞反応はなく、肺胞中隔に浮腫性変化がみられただけであった。

b 2日後：菌体を囲む多形核白血球やマクロファージによる小病巣が終末細気管支以下の細葉に散見され、すでに凝固壊死巣も出現する一方、星芒体も観察された (Fig. 23)。また、この壊死巣中には、多形核白血球やマクロファージに貪食された胞子や、すでに菌糸型に発育している菌体も見られた。電顕的には、多形核白血球に貪食されている胞子や菌糸の表面に電子密度の高い物質が見られた (Fig. 24) が、マクロファージに貪食されている胞子にはそのような物質が認められなかった (Fig. 25)。肺胞中隔は本来の構造を保っていた。

c 4日後：細気管支周囲の肺胞内に壊死巣が形成され、Grocott 染色で菌糸が発育している状態が見られたが、肺胞中隔の構造は依然保たれていた。

d 8日後：壊死巣がさらに拡大し菌糸は肺固有の構造を破壊し (Fig. 26, 27)、一部で血管壁に浸潤していた像も見られた。しかし、病巣は肺のみに形成され、他臓器では認められなかった。

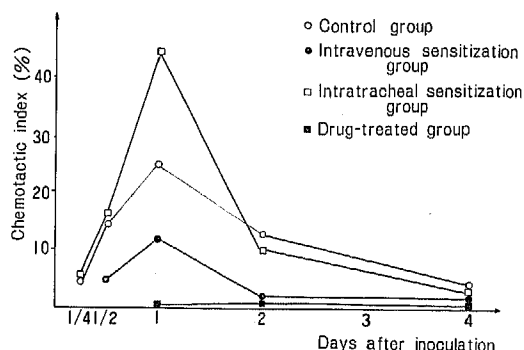


Fig. 28 Chemotaxis of alveolar macrophages of the animals in each group.

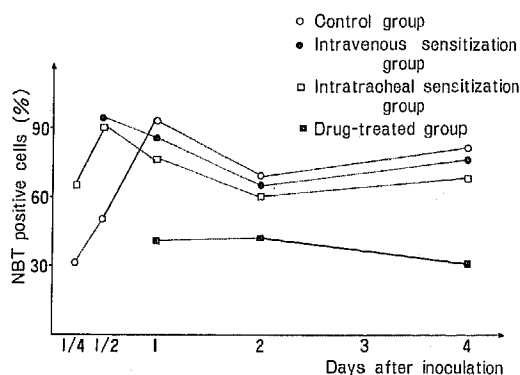


Fig. 29 NBT reduction ratios of alveolar macrophages of the animals in each group.

#### E 肺胞マクロファージの遊走能および殺菌能

各群の2～3羽の家兎の肺胞マクロファージについて、その機能を検討した。

##### 1 遊走能

対照群においては、肺胞洗浄液から約  $0.5 \sim 1.2 \times 10^6$  個/ml のマクロファージが得られた。Fig. 28のごとく、遊走能は胞子接種1日後までしだいに活発になったが、2ないし4日後には漸減して行く一峰性の型を示した。経静脈感作群も同様で、1日後にピークを示した。経気道感作群では、 $1.2 \sim 1.5 \times 10^6$  個/ml のマクロファージが得られ、遊走能は、12時間、1日後は著しく活発であったが、その後は同様に漸減する型を示した。抗癌剤投与群では、ほとんど細胞成分が肺胞洗浄液に含まれず、遊走活性は低値であった。



## 2 殺菌能

Fig. 29 に示すように、対照群では1日後まで殺菌能が高まったが、2日後僅かに低下し、4日後再び上昇した。経静脈感作群、経気道感作群とも12時間後にピークを示し、1ないし2日後とやや低下したが、4日後に再び上昇した。抗癌剤投与群では、全体として低下していた。

## IV 考 察

いわゆる opportunistic infection をおこす病原性の弱い寄生体が生体内に侵入した場合、その経過はほとんどが宿主側の因子により左右され、一度侵入すると宿主条件が変わらない限り治療に著しく抵抗する<sup>15)-17)</sup>。ヒトの肺アスペルギルス症はさまざまな病型を示すが、その病巣形成の過程は必ずしも明らかではない。今回の実験では、1回だけ接種されたアスペルギルス生菌に対し宿主肺がいかに応答するかを実験的に観察することが目的であり、そのため菌種として病原性がそれほど強くなく、血清抗体価の上昇しやすい株を用いた。

一般に炎症反応は、組織障害に始まり、微小循環系の変化に引き続いて各種炎症性の細胞浸潤がおり、やがてそれが吸収されるか、肉芽形成により治癒に向かう。本実験各群においても、この原則に従って病変が進行したが、個々の過程においては群によって著しい違いがみられた。各群とも気道内に接種されたアスペルギルス胞子は約6～12時間後には末梢肺胞内に到達し、生体側の応答が開始される。対照群において、経時的な組織所見は、Cooper<sup>18)</sup>、Thurston<sup>19)</sup>、Austwick<sup>20)</sup>や小坂<sup>21)</sup>の実験とほぼ同じ過程<sup>22)</sup>を示し、最終的には肉芽腫性病巣を形成して菌体を排除したが、肺の構造はほとんど損なわれない。一方、宿主側の応答を病巣に浸潤してくる細胞の動態からみると、多形核白血球については、生菌胞子接種後6時間から12時間たつと、肺胞内や肺胞中隔に浸潤し、24時間後からは菌体を囲んで集簇がおり、2日後に頂点に達したが、以後しだいに減少した。マクロファージは、12時間までは多形核白血球と肺胞内に共存するが、その後の数日間の応答は軽く、ほぼ4日後には顕著な浸潤を示した。このマクロファージの動きは、AdamsonとBowden<sup>23)-27)</sup>の異物に対するマウスの実験と同様な傾向を示した。すなわち、大きなカーボン粒子を気管から肺に注入すると、まず初期に多形核白血球とマクロファージの浸潤がみられる。2日目からは多形核白血

球は減少し始めるが、マクロファージの数は一定であり、4日目からマクロファージだけが増加する2相性の型を示すという。また、Wilkinson<sup>28)</sup>の腹腔内ヘグリコーゲン注入した実験でも多形核白血球は注入後の数時間と24時間に多数の浸潤が2相性にみられる一方、マクロファージは6時間までは多形核白血球と同時に出現するが、その後の数日間は一一定となり、再び徐々に増加し、4日後にピークに達する事実を観察している。これらにより、病原性のない異物または弱い異物に対する正常個体の応答の基本は、侵入初期には異物に対してマクロファージと多形核白血球が応答し、4日以後にはおもにマクロファージが応答する型を取ると考えられる。GreenとKass<sup>29)</sup>は、このマクロファージについて、異物食後は mucociliary stream により肺から排除されるという単なる scavenger としての機能を強調し、Green<sup>30)</sup>は、*Aspergillus terreus* を用いた実験で、胞子を吸入させると3時間以内に肺マクロファージにより95%は食食されてしまい、多形核白血球の関与は少ないと報告している。またMerkow<sup>31)</sup>は、アスペルギルス胞子は吸入後、4時間以内にマクロファージの細胞質内に取り込まれて lysosome と融合し、やがて破壊されたことを観察し、感染後数時間以内のマクロファージの役割を強調している。今回の実験では、感染初期のマクロファージ殺菌能が高まっていたことより、初期に浸潤したマクロファージの非特異的な食食や殺菌が、Green<sup>30)</sup>やMerkow<sup>31)</sup>の言うごとく行われていたと考えられる。しかし、多形核白血球とアスペルギルス胞子との反応がおおむね終了した時点で動員される、いわゆる第2相のマクロファージは、菌体や菌体成分を保有する多形核白血球に対して何らかの特異的な反応を呈示すると考えられる<sup>32)33)</sup>。その理由として、肺組織からの真菌培養がその時点で陰性になることや胞子の食食能が初期のマクロファージより活発なこと、殺菌能が再び活発になっていることなどがあげられる。つまり、対照群において、アスペルギルス胞子に対する宿主側の応答は、きわめて早い時期の多形核白血球と非特異的なマクロファージによる応答であり、ここで胞子が充分破壊、処理されないと“活性化されたマクロファージ”が出現し、Spectorの述べている high turn granuloma<sup>34)</sup>を形成して胞子を排除して行くと考えられる。Adamson<sup>25)-29)</sup>は、初期のマクロファージの浸潤はおもに血中の単球に由来するもので、第2相のマクロファージには肺胞間質において間質細

胞の増殖したものと、単球に由来するものがあると報告している。しかし今回の実験では、肺胞間質におけるマクロファージの分裂、増生は認められなかった。また Williams ら<sup>6)</sup>はヌードマウスを用いた実験で、アスペルギルス胞子に対して多形核白血球や血清抗体は、その殺菌に効力を示さず、むしろTリンパ球の関与する細胞性免疫と、抗原提供細胞としてのマクロファージの重要性を観察している。しかし、今回の実験の対照群でも明らかなように、アスペルギルスの胞子に対する多形核白血球の初期反応は、多形核白血球が殺菌の中心的な役割を演じていることを示している。

経静脈感作群における宿主側の応答をみると、まず菌体の多糖体成分に対する抗体が産生されており<sup>8)</sup>、また早期から著明な多形核白血球反応が出現している。しかも病巣部では、多形核白血球に貪食されている胞子の像が多数みられ、壊死傾向や肺胞中隔への影響も対照群に比べて強いが、菌の排除は必ずしも促進されなかった。Johnson ら<sup>35)36)</sup>は、抗原の感作を受けて抗体を産生している動物に抗原を吸入させると多形核白血球の浸潤が著しく、Ⅲ型アレルギー反応が肺でもおこっていることを報告している。今回の実験においても、血清抗体が産生され多形核白血球の浸潤が著しいことより、オプソニン抗体の関与とⅢ型アレルギーの関与とが示唆された。しかも本実験系においては、沈降抗体価が約32倍以上の家兎においてアレルギー反応がみられ、それ以下の抗体価の家兎よりも激しい病巣がみられたことより、個体の状態により病像も異なることが示された。高橋と岩田<sup>37)</sup>の実験でも、感作は組織の壊死傾向を促進し感染を助長すると言う解釈や、真菌感染における液性免疫は抗菌的に働かず逆に養菌的作用を持つ場合もあるとの安平<sup>38)</sup>の指摘もある。応答する細胞の観察から、多形核白血球によっても処理しきれなかったアスペルギルス胞子は、最終的には“活性化されたマクロファージ”によって処理されたと考えられる。

経気道感作群において、感作の過程で終末細気管支の周辺から肺胞にかけて出現するマクロファージは、投与されたホルマリン死菌を貪食処理したと思われるPAS および Grocott 染色陽性顆粒を大量に含んでいたことから、これらはいわゆる活性化マクロファージと考えられる。この群の生菌に対する宿主側の応答は、活性化マクロファージと少数の多形核白血球であり、接種された生菌の大部分は直ちに貪食された。一方、BSA により気道感作を行っても、アスペルギル

スに対する貪食や殺菌能は対照群と同程度であった。したがってホルマリン死菌により経気道的に活性化されたマクロファージは、生菌に対しても特異的な反応を示したと言えよう。アスペルギルスを大量かつ頻回に気道内に投与することにより、血清抗体が産生されることは、Thurston ら<sup>19)39)</sup>により報告されているが、これはアスペルギルス胞子を繰り返し吸入することにより発症すると言われているアレルギー性アスペルギルス症の1つに相当すると考えられている。今回の実験でも Katzenstein ら<sup>40)-42)</sup>の言う broncho-centric granulomatosis に類似の組織像が観察されたことから、アレルギー性アスペルギルス症に近い反応と考えられる。

抗癌剤投与群においては、報告された多くの研究<sup>43)-45)</sup>と同様に、宿主側は接種1日後にほとんど応答を示すことができず、これにより胞子は発育し、菌糸が周囲組織を破壊しながら増えて行くものと考えられる。

Adams<sup>46)</sup>はマクロファージの浸潤様式をその原因物質によって、形態的に chronic inflammation, mature granulomas, epithelioid cell granulomas とに分けた。しかも mature granuloma は、浸潤したマクロファージが特殊な物質を持続的に保持している場合、あるいは遅延型アレルギーが加わった場合には、epithelioid granuloma に移行すると言っている。本実験の対照群や経静脈感作群および経気道感作群においては mature granuloma を形成することから、*Aspergillus fumigatus* は一応 mature granuloma を形成する起炎体と考えられる。しかし、epithelioid 型の肉芽腫性病巣は確認されず、また皮内反応でも遅延型アレルギーが成立していないことより、今回の実験によって作られた肉芽腫性病巣には、遅延型アレルギーの関与はないものと想定される。

ヒトの肺アスペルギルス症<sup>47)</sup>と本実験を比較してみると、ヒトの侵襲性肺炎型病巣は、明らかに抗癌剤投与群の病巣と一致し、しかもアスペルギルス胞子は侵入2日後すでに終末細気管支や肺胞内で菌糸に発育し、血管壁への侵襲さえも早くから観察された。ヒトの菌球型では、アスペルギルス抗原に対する沈降抗体の陽性率は高い。今回の経静脈感作群では、沈降抗体が陽性で、Ⅲ型アレルギーの関与が明らかであった。このような実験群で空洞形成を誘発する操作を行った場合、ヒトの菌球型病巣に近づく可能性もある。それにくらべ経気道感作群においては、沈降抗体が陽性でありながら、肺の真菌培養は生菌接種後すみやかに陰

性化し、マクロファージや多核巨細胞による肉芽腫性病巣が末梢気管支壁に見られたことより、ヒトのアレルギー型肺アスペルギルスの実験モデルとして今後の検討の対象となり得るであろう。

以上、宿主条件を変えることによって発生するアスペルギルスに対する反応の違いについて、主として組織学的解析を行った。

## V 結 語

1 *Aspergillus fumigatus* に対する対照家兎の肺における基本的反応は、胞子の侵入初期には、主として多形核白血球が応答するが、数日後には活性化されたマクロファージが応答した。

2 経静脈的にホルマリン死菌で感作された家兎では、上記反応の初期に血清抗体による菌体のオプソニン化がおこり、多形核白血球のさらに著しい応答によりⅢ型アレルギーが関与することが推定された。

3 経気道的にホルマリン死菌で感作された家兎では、接種初期からすでに活性化されたマクロファージが応答し、ヒトのアレルギー性アスペルギルス症に近い像を呈した。

4 抗癌剤投与による家兎では、各種ヒト剖検例におけるごとく、組織反応の乏しい凝固壊死性病巣を形

成し、多形核白血球やマクロファージの著しい機能低下が示唆された。

5 *Aspergillus fumigatus* に対する肉芽腫性病巣は、本実験では、いわゆる mature granuloma に相当し、epithelioid granuloma の所見は得られなかった。

なお、本論文の要旨は、第8回国際医真菌学会(1982年2月, Palmerston North, New Zealand), 第71回日本病理学会総会(1982年4月, 東京)および第3回日本炎症学会総会(1982年7月, 東京)において発表した。

稿を終るにあたり、懇篤なる御指導、御校閲を賜りました恩師発地雅夫教授に深甚なる謝意を表します。同時に本研究に際し、御教示御指導下さいました井門慎介講師ならびに勝山 努助教授(現 信大中央検査部)、藤原 正之 講師(現 市立岡谷病院病理科)をはじめとする病理学教室の諸兄に深く感謝します。さらに、標本作製に御協力をいただいた当教室滝沢淳子、羽山正義、百瀬友幸、丸子中央病院病理検査室田中純子、滝沢富士江および総合研究室市川良治、中平敦子の諸氏に心から感謝致します。

## 文 献

- Hotchi, M., Okada, M. and Nasu, T. : Present state of fungal infections in autopsy cases in Japan. A statistical survey of all autopsy cases during the ten year period from 1966 to 1975. *Am J Clin Pathol*, 74 : 40-46, 1980
- 発地雅夫 : 肺炎型アスペルギルス症. *日本臨牀*, 38 : 97-102, 1980
- Sidransky, H. and Verney, E. : Experimental aspergillosis. *Lab Invest*, 11 : 1172-1183, 1962
- Sidransky, H. : Experimental studies with aspergillosis. In : Chick, E.W., Balows, A. and Furcolow, M.L. (eds.), *Opportunistic Fungal Infections*, pp. 165-176, Charles C Thomas Publisher, Springfield, 1975
- Epstein, S.M., Verney, E., Miale, T.D. and Sidransky, H. : Studies on the pathogenesis of experimental pulmonary aspergillosis. *Am J Pathol*, 51 : 769-788, 1967
- Williams, D.M., Weiner, M.H. and Drutz, D.J. : Immunologic studies of disseminated infection with *Aspergillus fumigatus* in the nude mouse. *J Infect Dis*, 143 : 726-733, 1981
- McFarland, J. and L'engle, E.M. : The specific nature of opsonins. *JAMA*, 49 : 1178-1181, 1907
- Hotchi, M. : The application of fluorescent antibody techniques to the identification of pathogenic fungi in tissue specimens. *Med J Shinshu Univ*, 12 : 123-139, 1967
- 田中敬一 : 生物試料作製法. 田中敬一, 永谷 隆(編), 図説走査電子顕微鏡, pp. 57-84, 朝倉書店, 東京, 1980
- Myrvik, Q.N., Leake, E.S. and Fariss, B. : Studies on pulmonary alveolar macrophages from the normal rabbit. A technique to procure them in a high state of purity. *J Immunol*, 86 : 128-132, 1961
- Horwitz, D.A. and Garrett, M.A. : Use of leukocyte chemotaxis in vitro to assay mediators

- generated by immune reactions. J Immunol, 106 : 649-655, 1971
- 12) 志摩 清, 樋口定信, 岳中耐夫, 外村洋一 : マクロファージの遊走能. 臨床免疫, 13 : 390-395, 1981
- 13) Park, B.H., Fikrig, S.M. and Smithwick, E.M. : Infection and nitroblue tetrazolium reduction by neutrophils. Lancet, 2 : 532-534, 1968
- 14) 志摩 清, 樋口定信, 岳中耐夫 : マクロファージの代謝能. 臨床免疫, 13 : 396-402, 1981
- 15) 池本秀雄 : 内臓真菌症の治療, とくに化学療法. 日本臨牀, 38 : 146-152, 1980
- 16) Pepys, J. : Therapy of aspergillosis, clinical aspects. In : De Haller, R. and Suter, F. (eds.), Aspergillosis and Farmer's Lung in Man and Animal, pp. 129-130, Hans Huber Publishers, Bern, 1974
- 17) Scholer, H.J. : Experimental chemotherapy of aspergillosis In : De Haller, R. and Suter, F. (eds.), Aspergillosis and Farmer's Lung in Man and Animal, pp. 136-147, Hans Huber Publishers, Bern, 1974
- 18) Cooper, N.S. : Acute bronchopneumonia due to *A. fumigatus fresenius* : report case with description of acute and granulomatous lesion produced by fungus in rabbit. Arch Pathol, 42 : 644-648, 1946
- 19) Thurston, J.R., Cysewski, S.J. and Richard, J.L. : Exposure of rabbits to spores of *Aspergillus fumigatus* or *Penicillium* sp : survival of fungi and microscopic changes in the respiratory and gastrointestinal tracts. Am J Vet Res, 40 : 1443-1449, 1979
- 20) Austwick, P.K.C. : Clinical and pathological aspects in animals. In : De Haller, R. and Suter, F. (eds.), Aspergillosis and Farmer's Lung in Man and Animal, pp. 88-93, Hans Huber Publishers, Bern, 1974
- 21) 小坂不二彦 : 肺アスペルジラス症の病理 (後編). 真菌誌, 6 : 93-108, 1965
- 22) Bardana, E.J. : The clinical spectrum of aspergillosis-part 1, epidemiology, pathogenicity, infection in animals and immunology of *Aspergillus*. CRC Crit Rev Clin Lab Sci, 13 : 21-81, 1981
- 23) Bowden, D.H. and Adamson, I.Y.R. : Adaptive responses of the pulmonary macrophagic system to carbon. I. Kinetic studies. Lab Invest, 38 : 422-429, 1978
- 24) Adamson, I.Y.R. and Bowden, D.H. : Adaptive responses of the pulmonary macrophagic system to carbon. II. Morphologic studies. Lab Invest, 38 : 430-438, 1978
- 25) Bowden, D.H. and Adamson, I.Y.R. : Role of monocytes and interstitial cells in the generation of alveolar macrophages. I. Kinetic studies of normal mice. Lab Invest, 42 : 511-517, 1980
- 26) Adamson, I.Y.R. and Bowden, D.H. : Role of monocytes and interstitial cells in the generation of alveolar macrophages. II. Kinetic studies after carbon loading. Lab Invest, 42 : 518-524, 1980
- 27) Adamson, I.Y.R. and Bowden, D.H. : Chemotactic and mitogenic components of the alveolar macrophage response to particles and neutrophil chemoattractant. Am J Pathol, 109 : 71-79, 1982
- 28) Wilkinson, P.C. : The role of chemotaxis in inflammatory reactions. In : Wilkinson, P.C. (ed.), Chemotaxis and Inflammation, pp. 149-167, Churchill Livingstone, Edinburgh, 1974
- 29) Green, G.M. and Kass, E.H. : The role of the alveolar macrophage in the clearance of bacteria from the lung. J Exp Med, 119 : 169-175, 1964
- 30) Green, F.H.Y., Olenchock, S.A., Willard, P.A. and Major, P.C. : SEM studies on the in vivo uptake of *Aspergillus terreus* spores by alveolar macrophages. Scan Electron Microsc, III : 307-314, 1980
- 31) Merkow, L.P., Epstein, S.M., Sidransky, H., Verney, E. and Pardo, M. : The pathogenesis of experimental pulmonary aspergillosis. Am J Pathol, 62 : 57-66, 1971
- 32) 三上 襄, 横山耕治, 新井 正 : 真菌感染症とマクロファージ. 真菌誌, 19 : 203-207, 1978
- 33) 武谷健二 : 食細胞と感染抵抗. 水野伝一, 武谷健二, 石田名香雄 (編), 生体防御の機構, pp. 133-147, 東京大学出版会, 東京, 1980

- 34) Spector, W.G. : Chronic inflammation. In : Zweifach, B.W., Grant, L. and McCluskey, R.T. (eds.), The Inflammatory Process Vol. III, pp.277-290, Academic Press, New York, 1974
- 35) Johnson, K.J. and Ward, P.A. : Acute immunologic pulmonary alveolitis. J Clin Invest, 54 : 349-357, 1974
- 36) Johnson, K.J., Anderson, T.P. and Ward, P.A. : Suppression of immune complex-induced inflammation by the chemotactic factor inactivator. J Clin Invest, 59 : 951-958, 1977
- 37) 高橋昭三, 岩田和夫 : 実験的肺アスペルギルス症成立における感作の意義. 真菌誌, 7 : 147-155, 1966
- 38) 安平公夫 : 真菌症と肉芽. 真菌誌, 17 : 84-91, 1976
- 39) Thurston, J.R., Ricard, J.L. and Cysewski, S.J. : Antibody formation in rabbits exposed to aerosols containing spores of *Aspergillus fumigatus*. Am J Vet Res, 36 : 899-901, 1975
- 40) Katzenstein, A., Liebow, A.A. and Friedman, P.J. : Bronchocentric granulomatosis, mucoid impaction, and hypersensitivity reactions to fungi. Am Rev Respir Dis, 111 : 497-537, 1975
- 41) Bardana, E.J. : The clinical spectrum of aspergillosis part 2 : classification and description of saprophytic, allergic, and invasive variants of human disease. CRC Crit Rev Clin Lab Sci, 13 : 84-159, 1980
- 42) Koss, M.N., Robinson, R.G. and Hochholzer, L. : Bronchocentric granulomatosis. Hum Pathol, 12 : 632-638, 1981
- 43) Gruhn, J.G. and Sanson, J. : Mycotic infections in leukemic patients at autopsy. Cancer, 16 : 61-73, 1963
- 44) Mukherji, A.K. and Basu Mallick, K.C. : Disseminated candidosis in cyclophosphamide induced leucopenic state : an experimental study. Indian J Med Res, 60 : 1584-1591, 1972
- 45) Ford, S., Baker, R.D. and Friedman, L. : Cellular reactions and pathology in experimental disseminated aspergillosis. J Infect Dis, 118 : 370-376, 1968
- 46) Adams, D.O. : The biology of the granuloma. In : Ioachim, H.L. (ed.), Pathology of Granulomas, pp.1-20, Raven Press, New York, 1983
- 47) Batten, J. : Clinical aspects of *Aspergillus* infection in man. In : De Haller, R. and Suter, F. (eds). Aspergillosis and Farmer's Lung in Man and Animal, pp.61-68, Hans Huber Publishers, Bern, 1974

(58.10.12 受稿)