

結核症とリパーゼに関する組織化学的研究

第1報 結核病巣のリパーゼおよび脂質について

大阪大学微生物病研究所竹尾結核研究部第Ⅱ部（指導教授：堀 三津夫）

大島 義男・萩原 隆・水田 靖彦

大阪大学医学部第Ⅲ内科学教室

服部 正次・三島 淳三郎

（受付 昭和30年7月16日）

本論文の要旨は第6回日本結核病学会近畿地方会に発表した。

結核症とリパーゼとの関連性についてはかなり古くから研究されており、肺組織がリパーゼ作用を示すことは Sieber¹⁾ がはじめて報告し、Capelli, Calmette²⁾ 等は結核組織のリパーゼが結核菌に作用することを認めた。さらに Kanócz^{3,4)} は健康モルモットの肺のリパーゼを抽出し之に結核菌の蠟様被膜を除く作用があることを報じた。しかし結核症における肺のリパーゼ作用の強弱に関する諸家の成績はまちまちであり、Happold and Taylor^{5,6)}、Takebayashi⁷⁾ は増強すると述べ、Katschneff⁸⁾ は減弱するといひ、Rordorf⁹⁾、Virtanen and Suomalainen¹⁰⁾ 等は健康動物と結核動物の肺のリパーゼ作用に差異を認めないと述べている。肺リパーゼの作用を組織化学的に検索したものには Gomori^{11,12,13)} の報告を見るのみであり彼は乾酪物質を有する病巣の周縁部の類上皮細胞および巨細胞にリパーゼが陽性で、健康動物には肺胞壁の Septal cell に陽性であると述べている。一方結核病巣における脂肪変性については古く Rosenthal, Vallillo^{14), 15)} の記載に始まり、Fischler and Gross, Chausse, Sata,¹⁶⁾ Hagemeister, Herxheimer, Joest^{17), 18)} 等枚挙にいとまがないが、諸家の所見は乾酪巣には脂質はほとんど認められないとしており、乾酪巣周縁部の類上皮細胞、巨細胞の細胞質内に陽性であることに一致している。この細胞質内脂質の起源に関しては Virchow 以来いくた論議の対象となつたものであつて、Wells²²⁾ が総合的にそれらの業績を紹介しているが、細胞の脂質摂取と一方には細胞内正常代謝過程の異常による膠質化学的変調の結果 lipoprotein より脂質が分離して顕微的に証明可能となる二つの要因、および両者の併存の場合が考えられると述べている。

われわれは組織化学的に人および実験動物の結核肺のリパーゼと脂質の染色を行い、リパーゼと肺結核病変との関係ならびに脂肪変性との関係につき研究した。一方

結核菌体リパーゼと組織リパーゼの区別を試みた。

I. 結核肺のリパーゼと脂質について

実験材料：次の如き肺組織を用いた。

- 人……………20例の肺結核患者から肺部分切除あるいは区域切除により取り出したもの
- モルモット…強毒人型結核菌高垣株 $1/10,000$ mg 右大腿皮下接種後7カ月して屠殺剖検した8匹(初感染群)
上記と同様初感染し4カ月後に強毒人型結核菌 SM 耐性吹田株 $1/5,000$ mg を皮下に再感染し、3カ月後に屠殺剖検した6匹(再感染群)
- マウス…強毒人型結核菌 SM 耐性吹田株 $1/5$ mg を腹腔内感染後6週を経て屠殺剖検した6匹(初感染群)
未感染のまゝ放置した6匹(健康対照群)
- 家兎…牛型強毒結核菌三輪株を 3 mg/kg づつ静脈内感染し1月後に屠殺剖検した3匹(牛型三輪感染群)
BCG を 3 mg/kg づつ静脈内感染し1月後に屠殺剖検した3匹(BCG感染群)

固定と包埋：アセトン固定および減圧下のパラフィン包埋でわれわれの前報に記したと同様である。切片はすべて8 μ とした。

リパーゼの証明法：大体 Gomori²⁴⁾ の方法に準じたが、基質として Tween80 と花王石鹼研究部製の Emasol (Polyoxyethylene sorbitan-mono stearate) を用いた。また基質の溶媒には Michaelis m/10 HCl-Barbital Buffer (pH 7.2) を用いた。

対照として切片を5%カルボール水溶液に30分浸した後、染色を行つたものと、基質を含まない溶液に incubate するものを行つた。

脂質の染色：ホルマリン固定後カーボワックスに包埋した切片につき、Jackson の Acetic-Carbol-Sudan

■染色を 37°C 4時間行つた。

ヘマトキシリン・エオジン染色，結核菌染色を平行的に行つた。

人肺材料の染色所見：

Tween 80 を基質とした場合は乾酪巣内に点々と黄褐色の顆粒がリパーゼ陽性を示し，時に類上皮細胞やラングハンス氏巨細胞の細胞質に桿状の黄褐色のリパーゼ陽性物質を認めるが，これらは結核菌染色による抗酸性物質と同位置同形態である。他部はすべて陰性である。

Emasol を基質とした場合は類上皮細胞，ラングハンス氏巨細胞，大単球の細胞質にリパーゼ陽性で，空洞壁や結核結節周縁のセンイ芽細胞組織球の細胞質にも陽性である。これらの陽性物質は黄色の勝つた褐色で大小種々の顆粒状であり結核菌単個菌の大きさより遙かに大きい。乾酪巣内にも同様な黄褐色陽性物質が点在するがこれは対照の切片でも認められるから必ずしもリパーゼの反応とは解し難い。病巣以外の肺胞壁にみられる組織球，肥大或は剝離の状態にある肺胞上皮細胞などの細胞質にもリパーゼ反応陽性である。以上はそれぞれ対照切片と比較した所見であるが，100°C 10分切片を加熱後リパーゼ染色を行うと乳酪巣を除いて他部の黄褐色大小顆粒状の陽性物質は全く非活性化されて認められなくなる。気管支上皮細胞，軟骨細胞，リンパ濾胞は常に陰性である。

脂質の染色では乾酪巣や空洞の被膜に存する類上皮細胞およびセンイ芽細胞にはその細胞質に陽性の細かい顆粒が認められ，ラングハンス氏巨細胞は乾酪巣に接して存在するものには細胞質に上と同様な脂質を有するが，乾酪巣から離れている巨細胞にはこのような顆粒を含まず核の近傍に薄く橙紅色瀰漫性の染色物を認めるに過ぎない。乾酪巣外側部はやはり橙紅色瀰漫性に染色されその中に微細な橙紅色の顆粒が認められる。滲出性結核病変の肺胞腔および肺胞壁に存在する大単球にも多量の脂質が認められ，類リンパ球，多核白血球には認められない。その他肥厚した肺胞壁内の大単球にも多量の脂質を有するものが多い。気管支上皮細胞は陰性である。

モルモット肺の所見：

Tween 80 を基質とした場合のリパーゼは人の肺の染色所見と同様である。

Emasol を基質とした場合は初感染群と再感染群間に本質的な差異は認められず，ともに類上皮細胞，肺胞壁肥厚部に増殖した大単球の細胞質に強い活性がみられる。また肺胞上皮細胞にも強い活性が認められることが多い。健康モルモットでは肺胞上皮細胞，気管支上皮細胞にリパーゼ陽性である。一般にモルモット肺のリパーゼ活性は後述する家兎マウス肺の所見に比し不定であつて，上記の細胞にも時に陰性を示すことが少くない。

脂質の染色では初感染群と再感染群間に差異はなく，乾酪巣周縁の類上皮細胞，センイ芽細胞の細胞質に陽性

顆粒がみられ，結核結節以外の場所では肺胞壁肥厚部の大単球に時に陽性であるのみで他は陰性である。巨細胞の出現はどの例にも認められなかつた。健康モルモット肺には陽性の細胞を認めなかつた。

マウス肺の所見：

Tween 80 を基質とした場合は上記の人の場合と全く同様である。

Emasol を基質とした場合は結核感染群ではいずれも広範囲な乾酪巣が形成され，この部にははつきりした陽性物質はみられず，類上皮細胞や大単球の細胞質に強いリパーゼ活性を認める。気管支上皮細胞および肺胞上皮細胞は健康マウスと全く同じく共に強いリパーゼ活性を認める。

脂質染色では健康マウスには陽性の細胞を認めないが，結核マウスでは乾酪巣周縁部の類上皮細胞および大単球の細胞質に強く陽性であり乾酪巣は淡く橙紅色に染色される。

家兎肺の所見：

牛型三輪感染群，BCG感染群共に肺胞壁の肥厚が極めて顕著で，結核結節が散在しており前者では乾酪巣を認める。

Tween 80 を基質とした場合は上記人の場合と全く同様である。

Emasol を基質とした場合は両感染群間に差異を認めず，ともに類上皮細胞大単球，ラングハンス氏巨細胞の細胞質に強い活性を認め，また肺胞上皮細胞，気管支上皮細胞にも強い活性を認める。乾酪巣はほとんど活性を認めない。家兎肺のリパーゼ染色所見はモルモットのそれのように不定な結果ではなく，常に上記の細胞内に強い活性を認めたことが特異である。

脂質染色所見は再感染群内に本質的な差異はなく，類上皮細胞や大単球の細胞質に時に陽性である。乾酪巣の所見はマウスと同様であり淡橙色の平等に染る物質が認められる。

II. 結核菌のリパーゼについて

実験方法：人型強毒結核菌高菌株，BCG，鳥型結核菌の菌集落をそれぞれスライドグラスに白金耳にて塗抹して24時間入室でアセトン固定を行うかあるいはそのまま48時間アセトン固定後パラフィン包埋し切片として前述のリパーゼ反応を行つた。対照として100°C 10分加熱及び5%石炭酸水に10分浸漬後同様にリパーゼ反応を行つた。

実験成績：結核菌は Tween 80 を基質とした時も Emasol を用いた時もともに単個菌は黄褐色の桿状或は分枝状形態として染色され，菌が小集塊をなしている場合は比較的大きな塊状の顆粒が密集して染出される。100°C 10分加熱することにより組織切片のリパーゼはほとんど完全に不活性化するが，結核菌では鳥型菌は染色

陽性のものが依然としてかなり存在し、高垣株およびBCGでは僅かながら染色陽性のものが認められる。5%カルボール浸漬後では結核菌はほとんどリパーゼ陰性となるが、依然としてごく僅かの褐色顆粒が染出される。

Ⅲ. 結核菌を貪食した多核白血球のリパーゼについて

実験方法：結核菌が細胞に貪食された場合のリパーゼ反応を知るために、健康家兎血液を遠心分離し白血球を集めて血清に浮遊し、これに10:1の割合でBCGおよび高垣株の2mg/ccの菌液を加え38°Cに保存し直後、3, 6, 9, 12時間後に一部を取り出してスライドグラスに塗抹乾燥後冷アセトンに一夜固定したものについてリパーゼ染色を行い、また100°C10分加熱したこれらの結核菌についても同様の実験を行った。一方牛型強毒結核菌三輪株、BCGをそれぞれ2mg/kg 静脈注射した家兎の血液を、注射直後と1週後に採血し、スライドグラスに塗抹して同様の実験を行った。結核菌染色は常に平行的に行つた。

実験成績：結核菌を貪食していない多核白血球は常にリパーゼ染色陰性である。結核菌を貪食させた多核白血球は細胞質内に桿状または分枝状形態の褐色の陽性物質を有し、時に大きな黄褐色の顆粒を有する。しかしこれらの陽性物質は白血球浮遊液と菌液との混合後の時間的経過によつて差異がなく、またTween80を基質とした時もEmasolを用いた時にも同様の染色所見である。加熱菌を貪食させた場合もこれと同様な所見がみられるが被染色物質は量的には遙かに少い。菌を静脈注射した家兎血液の塗抹標本では、菌接種直後では白血球の内外にリパーゼ反応陽性の桿状あるいはごく微細な褐色顆粒が認められ、これはTween80およびEmasolを基質とした場合全く同様の所見である。菌接種1週後では菌染色の所見では菌接種直後のものに比し結核菌が少いが、リパーゼ反応の所見もこれと平行している。

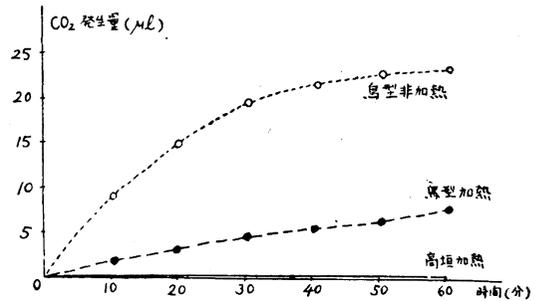
Ⅳ. Warburg氏検圧法による結核菌リパーゼ作用の測定

実験方法：以上の様にわれわれの用いた方法では100°C10分加熱結核菌がなおリパーゼ反応陽性であるので、これが結核菌のリパーゼ作用を意味するものか否かについて次の如く実験した。すなわちWarburg氏容器の主室に0.05Mの重炭酸ソーダの生理的食塩水液(pH7.8)を1.1cc, 菌液0.1cc。(湿菌量50mg/ccの鳥型結核菌あるいは人型菌高垣株およびそれぞれ100°C10分加熱したもの等)をいれ、側室には基質として終末濃度が1%となる割合にEmasol溶液を0.4ccいれ、容器腔は空気として38°Cで発生する炭素ガス量を測定した。また対照として①上記内容の容器中央小室にさらに20%KOH

をいれて発生する炭素ガスを吸収したもの、②上記容器内容から基質を除いたもの、③基質を除いてさらにKOHをいれたものを並列した。

実験成績：図に示した如く鳥型結核菌は100°C10分加熱によつてもリパーゼ活性は非加熱菌の約1/3に認められるが、加熱人型結核菌においてはリパーゼ活性は全く認められない。

図 Warburg氏検圧法による結核菌リパーゼ作用の測定



Ⅴ. 総括と考案

以上の成績を次のように総括ならびに考案する。

① 肺の結核病巣のリパーゼはEmasolを基質とした場合は、人および上記実験動物いずれにも、ラングハンス氏巨細胞、類上皮細胞、大単球の細胞質内に陽性であり、乾酪化巣周縁部のセンイ芽細胞、組織球の細胞質にも陽性のものが多い。人および家兎の結核肺では肺胞腔に向つて膨大したり肺胞腔に剝離脱落したいわゆる肺胞上皮細胞の細胞質に強いリパーゼ活性を認める。また健康動物の肺あるいは結核肺でも病変のない部分の気管支上皮細胞、肺胞上皮細胞の細胞質には常にリパーゼ活性を認める。以上の細胞がリパーゼを有することと結核菌との間にどのような関連があるかは不明である。

乾酪巣は肺の切片を基質を加えない溶液にincubateした場合も、あるいは切片を直接硝酸鉛液につけて後、多硫化アンモンで発色させても同様に黄褐色の顆粒を認めるから、乾酪巣内のリパーゼ反応陽性物質は脂肪酸およびそのCa塩のための反応が大部分であろうと考えられ、乾酪巣内の微弱なりパーゼ活性は組織化学的には証明が困難である。

② 結核病巣の脂質染色所見は、人では巨細胞、類上皮細胞、大単球、あるいは滲出性病巣の肺胞腔内にみる大単球の細胞質内に常に陽性顆粒を認め、大体リパーゼ染色所見と平行関係にあるが、実験動物ではほとんどの類上皮細胞、大単球がリパーゼ陽性であるにもかかわらず脂質染色では乾酪巣周辺の類上皮細胞、大単球のみが陽性であり、その所見は必ずしも平行的でない。また巨細胞では乾酪巣に接するものに殊に脂質顆粒が多く、Sudan III染色によると乾酪巣周縁の類上皮細胞の脂質が乾酪巣

の瀰漫性橙紅色に染るものに移行している像が認められる。

結核病巣における細胞内脂質顆粒の意義および起源に関して、既述の Wells の見解の他にも Hagemester は結核に特異なものではなく、血行障碍の結果起るのであると述べ、Joest は細胞質内に摂取された脂質がその細胞内に貪喰されている結核菌の代謝の影響を受けて次第に蓄積されたものであると解している。われわれの実験では、乾酪巣に接する巨細胞の細胞質に特に脂質の多いことは巨細胞が結核病巣に長期間存在することから、乾酪巣内の脂質などの処理像とも考えられ、また類上皮細胞、巨細胞、あるいは滲出性病巣の肺胞内にみる脂質顆粒の豊富な大単球（殊に無気肺に陥つた肺胞腔に著明）などの脂質が Wells のいう細胞の正常代謝の障碍に基づく為に生じたとも考えられる。

③ われわれは上述のように健康動物肺の気管支上皮細胞および肺胞上皮細胞の細胞質にリパーゼを証明した。健康動物の肺において脂質の合成分解が旺んであることは Sieber が多種の動物について検索しており、Kanócz は肺炎碎物のリパーゼ作用を検して摂食直後の動物ではリパーゼ作用は著しく減弱していると報告し、われわれも顕微化学的に摂食時マウス肺の肺胞上皮細胞のリパーゼ活性は、飢餓マウス肺のそれに比して著明に減弱していることを知った。また日笠は家兔静脈内に脂肪乳剤を注入した場合、まず肺胞上皮に脂質が染出され、一定時間後にはその脂質は細胞内で処理されて証明しえなくなると述べている。これらの成績は肺の旺んな脂質代謝を裏付けるものと考えられる。

④ 結核菌は Emasol を基質とした場合も Tween80 を基質とした時も、リパーゼ反応陽性に染るが、既述のように結核菌のリパーゼを非活性にした場合も量的に軽度ではあるが依然陽性反応を呈するので、結核菌のリパーゼ染色陽性物質はリパーゼそのもの場合と、結核菌が含有している脂肪酸による場合とがあり、われわれのリパーゼ染色法では両者の区別は困難である。また多核白血球に結核菌を貪喰させた場合のリパーゼ染色についても同様のことがいわれるが、白血球自体にはリパーゼ活性を認め得なかつた。

今回の結核菌のリパーゼ染色所見から結核菌には組織化学的に耐熱性リパーゼが存在するように思われるが、このような条件のもとでは結核菌体内に遊離の脂肪酸が存在する可能性もありなお検討を要し、Warburg 氏検圧法による実験では Kendall, Walker and Day, 山村等と同じく、人型結核菌には耐熱性エステラーゼを証明しえないことおよび鳥型菌には耐熱性エステラーゼが存在することを明かにした。

以上の成績から Gomori のリパーゼ証明法は組織については、組織細胞のリパーゼは Tween80 を基質とし

た場合は染色されず、また組織の 100°C 10分加熱あるいはカルボール浸漬によってもリパーゼ反応はほとんど完全に陰性となるから、Emasol を基質とした場合のリパーゼ反応陽性物質は組織細胞のリパーゼ活性を意味するものと考えられる。また Emasol あるいは Tween80 を基質とした場合時に結核病巣の巨細胞、類上皮細胞内に認められる桿状あるいは分枝状の褐色被染物質は結核菌に由来するものと考えられ、同時に作成した結核菌染色標本の所見とよく一致している。結核菌については上述したようにリパーゼ反応陽性であることが結核菌のリパーゼ活性のみを意味するや否やはなお今後の研究にまたねばならない。

⑤ Emasol を基質とした場合のリパーゼ反応はモルモットでは家兔、マウスのそれに比して不定であり、家兔の類上皮細胞や大単球のリパーゼ活性は常に強く染出される。実験動物の結核抵抗性とリパーゼ作用の関係については榎本はラツテがモルモットより Tributyrinase 作用が強いと述べ、Grogg and Pearse は家兔の単球のエステラーゼ活性がモルモットに比して非常に強いことを強調しているが、リパーゼ活性の強弱と動物の自然抵抗性の強弱との関係は今後に残された問題である。

VI. 結 語

① 人肺結核病巣のリパーゼは Emasol を基質とした場合、ラングハンス氏巨細胞、類上皮細胞および大単球の細胞質に陽性で、脂質染色陽性部位と大体平行関係にある。

② 実験動物の結核肺ではリパーゼは人の場合と同様な染色所見であるが、これは必ずしも脂質染色所見と平行しない。

③ 人および動物の肺結核病巣の乾酪巣は組織化学的にはリパーゼをほとんど証明しえないが、脂肪酸および脂質の存在が想像される。

④ 健康動物の気管支上皮細胞は強いリパーゼ活性を有し、肺の旺んな脂質代謝を想像させる。またその部位には脂質は認められない。

⑤ 組織リパーゼは Tween 80 を基質とした場合は陰性であるが、結核菌は Emasol および Tween 80 いずれを基質に用いても陽性に染り、組織リパーゼの場合と区別しうる。

⑥ 組織化学的染色所見から鳥型結核菌には耐熱性のリパーゼが存在し、人型結核菌および牛型結核菌にはほとんど存在しないようである。

⑦ 結核肺組織のリパーゼ反応はモルモットでは家兔、マウスのそれに比して不定であり、家兔の類上皮細胞や大単球のリパーゼ活性は常に強く染出される。

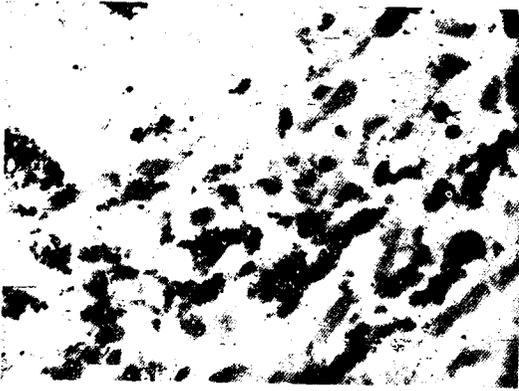
稿を終るに臨み、御指導御校閲を賜つた堀三津夫教授に深謝致します。

文 献

- 1) Sieber, N. : Ztschr. physiol. Chem., 55 : 177, 1908.
- 2) Capelli : Calmette : Brit. J. Exp. Path., 12 : 272, 1931. より引用
- 3) Kanócz, D. : Ztschr. Tbk., 53 : 124, 1929.
- 4) Kanócz, D. : Ibid, 63 : 113, 1932.
- 5) Happold, F. C. and Taylor, A. : Brit. J. Exp. Path., 12 : 272, 1931.
- 6) Happold, F. C. and Taylor, A. : Ibid, 8 : 101, 1927.
- 7) Takebayashi, H. : Beitr. klin. Tbk., 67 : 743, 1927.
- 8) Katschneff, N. : Biochem. Ztschr., 55 : 481, 1913.
- 9) Rordorf, G. : Arch. sci. biol. Italy, 20 : 442, 464, 1934.
- 10) Virtanen, A.I. and Suomalainen, P. : Nature, 133 : 532, 1934.
- 11) Gomori, G. : Proc. Soc. Exp. Biol. and med., 58 : 362, 1945.
- 12) Gomori, G. : Arch. Path., 41 : 121, 1946.
- 13) Gomori, G. : Am. J. Clin. Path., 16 : 347, 1946.
- 14) Rosenthal : Verhandl. deutsch. path. Gesellsch., 2 : 440, 1899.
- 15) Vallillo : La Tuberculosi, 4 : 257, 1911~12.
- 16) Fischler and Gross : Ziegler's Beitr., 7th suppl. : 344, 1905.
- 17) Chausse : Compt. rend. Soc. biol., 64 : 377 1909.
- 18) Sata, A. : Ziegler's Beitr., 28 : 461, 1920.
- 19) Hagemester, F. : Virchow's Arch., 172, : 72, 1903.
- 20) Herxheimer, G. : Ergeb. d. allerg. Path. u. path. Anat., 8 : 625, 1902.
- 21) Joest, E. : Virchow's Arch., 203 : 451, 1911,
- 22) Wells, H.G. and Long, E.R. : The Chemistry of Tuberculosis, IInd Edition : 169, 1932. (Williams and Wilkins Co., Baltimore)
Wells, H.G. : Chemical Pathology, 5th. Edition : 408, 1925. (Saunders Co. philadelphia)
- 23) 服部正次・大島義男・永田靖彦・森本健二・萩原隆 : 結核, 29 : 490, 1954.
- 24) Gomori, G. : microscopic Histochemistry, 205, 1953. (University of Chicago Press)
- 25) 日笠頼則 : 実験治療, 263 : 13, 昭和28年
- 26) Kendall, A.I., Walker, A. W., and Day, A. A. : J. Inf. Dis., 15 : 443, 1914.
- 27) Kendall, A.I., Walker, A. W. and Day, A.A. : J. Inf. Dis., 15 : 454, 1914.
- 28) 山村雄一, 小倉克彦, 今津史郎 : 結核, 28, 51, 1953.
- 29) 榎本敏雄 : 日新医学, 39 : 661, 1952.
- 30) Grogg, E. and Pearse, A.G.E. : Brit. J. Exp. Path. 33 : 567, 1952.

附 図

第 1 図



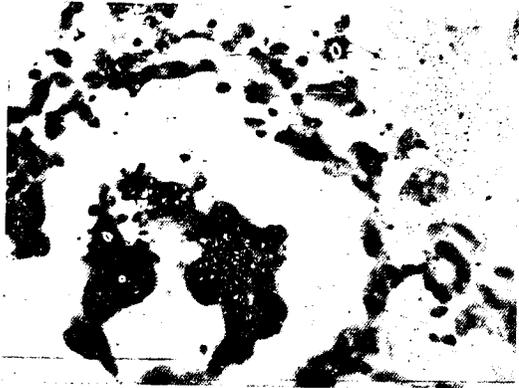
人肺結核病巣のリパーゼ反応(Emasol)
乾酪巣周囲の類上皮細胞及びセンイ芽
細胞に陽性(黒色に写る)。

第 2 図



同左 (Emasol)
ラングヘンス氏巨細胞に強陽性。

第 3 図



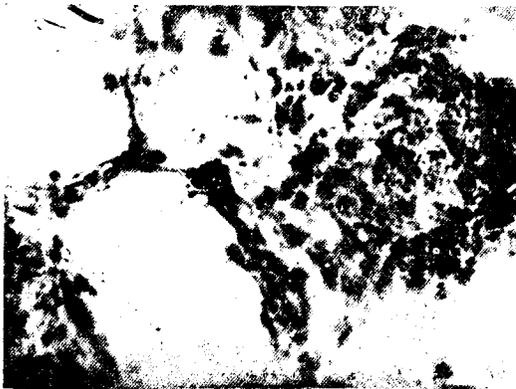
人肺結核病巣のリパーゼ反応
(Emasol)
肺胞内滲出大単球に強陽性。

第 4 図



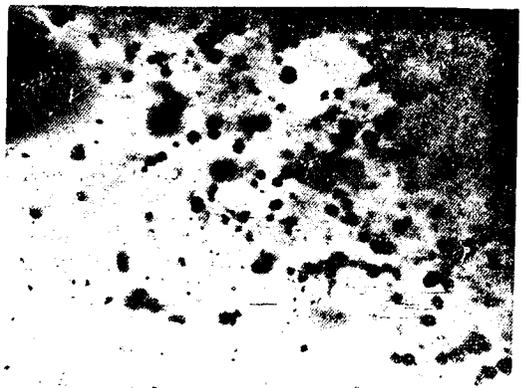
健康モルモット肺のリパーゼ反応
(Emasol) 気管支上皮細胞及び分泌腺
細胞に強陽性。

第 5 図



BCG接種家兎肺のリパーゼ反応
(Emasol)
結節状に増殖した大単球に陽性。

第 6 図



結核菌のリパーゼ反応 (Tween)
人型強毒結核菌高垣菌株塊を塗抹した
もの。

