

マウス実験結核症における肝・脾酸性  
phosphatase 活性の変化

金 井 興 美

国立予防衛生研究所結核部 (部長 室橋豊穂)

受付 昭和 39 年 1 月 9 日

CHANGE OF ACID PHOSPHATASE ACTIVITY OF THE  
LIVER AND THE SPLEEN IN EXPERIMENTAL  
MOUSE TUBERCULOSIS

Koomi KANAI\*

(Received for publication January 9, 1964)

Time-course observation of the acid phosphatase activity of the liver and the spleen was conducted in mice after intravenous infection with a bovine strain of tubercle bacilli (Ravenel).

The mice were of dd-line commercially available in this country, weighing about 20 g. Nonspecific acid phosphatase activity of the tissue homogenates was measured using p-nitrophenyl phosphate as substrate at pH 5.6 (0.1 M acetate buffer) and specific glucose-6-phosphatase of the liver was measured using sodium salt of G-6-P as substrate at pH 6.5 (0.1 M maleic acid buffer). Taking the swelling of the test organs into consideration, the activity was expressed as the amount of liberated p-nitrophenol or phosphate P by the whole organ in 60 minutes at 40°C for the former or in 15 minutes at 40°C for the latter. Then, per cent increase of the activity from normal (uninfected) was calculated and presented graphically.

As shown in Fig. 1, 2, and 3, acid phosphatase activity of the liver and the spleen was elevated in the course of infection. In the spleen, the maximum elevation was observed in the later period than the peak of the bacilli-multiplication curve. Once increased activity showed a tendency to decrease thereafter, perhaps corresponding to the stage of host-parasite equilibrium in tuberculous infection. On the other hand, G-6-Pase activity of the liver did not increase at all, but sometimes showed a lowered value.

G-6-Pase activity is the function of liver parenchymal cells, and acid phosphatase activity is that of Kupffer cells according to the cytochemical investigation of Thorbecke et al<sup>4)</sup>. Therefore, there is a good evidence to believe that the elevation of acid phosphatase activity of the spleen and the liver in tuberculous infection is an expression of the activated reticuloendothelial system. The swelling of these organs will be explained as the increase of cell numbers in the system.

\* From Department of Tuberculosis, National Institute of Health, Kamiosaki-Chojamaru, Shinagawa-ku, Tokyo, Japan.

結核感染の動態を把握する試みの一つとして、著者は感染組織内の生菌数の消長を分析して、宿主寄生物間に成立する生物学的平衡関係に考察を進めてきたが<sup>1)~3)</sup>、この問題をさらに検討するためには、次の2つの方向の

研究が必要と思われる。その1つは、生体内の結核菌の物質代謝、菌体成分、免疫原性の研究であり、他の1つは、宿主感染細胞の生物学的、生化学的検討である。後者に関しては喰菌中の網内系細胞の物質代謝にことに興

味がもたれるが、1961年 Thorbecke ら<sup>4)</sup>はマウス肝の細胞化学染色標本において、Kupffer の星細胞のみが特異的に酸性 phosphatase 活性を示し、しかも BCG 接種後にこの反応陽性細胞が増加することを報告した。この知見より出発して、われわれは結核感染マウスの肝乳剤について、酸性 phosphatase 活性の変化を  $\beta$ -glycerophosphate あるいは glucose-6-phosphate を基質として、それぞれ pH 5.6, 6.5 において測定し、その結果について予備的報告<sup>5)</sup>を行なった。すなわち  $\beta$ -glycerophosphate を基質とする活性は感染に伴って上昇し、glucose-6-phosphate を基質とする活性は逆に低下することを認めたが、前者は網内系の反応であり、後者は肝実質細胞の活性であるとみるべき幾多の理由より、この所見はさらに確認し、そして発展せしめるべきものと考えた。本報告では、その後に行なった実験を中心として、この酵素活性の変化の生物学的意義について論ずる。

#### 実験材料と方法

動物は市販 dd 系ハツカネズミの雄で、体重  $20 \pm 2g$  のものを使用した。感染用結核菌株は、Sauton 合成液体培地上に発育中の有毒牛型菌 Ravenel であり、手振法で蒸溜水菌液として使用した。感染は尾静脈内に行なった。

酸性 phosphatase 活性の測定には、前報告<sup>5)</sup>において Na- $\beta$ -glycerophosphate を基質として用いたが、今回はかわりに Disodium-p-nitrophenylphosphate を用いた。反応系は 1/10 M acetate buffer (pH 5.6) 0.7 ml, 0.5% の基質 0.2 ml, 組織乳剤 0.1 ml の全量 1.0 ml とし、混和後 40°C の恒温槽中に1時間放置し、ここで 1.0 ml の 1% NaOH を加えて反応停止、かつ遊離された p-nitrophenol を発色せしめ、さらに蒸溜水 1.0 ml を加えてこれを比色した。反応開始時に NaOH を加えた試験管を盲検とし、またあらかじめ作製された標準曲線より p-nitrophenol の遊離 mg 量を換算した。

特異的な glucose-6-phosphatase 活性の測定には、0.1 M glucose-6-phosphate (Na 塩) を基質とし、pH 6.5 の M/10 maleic acid buffer の環境で行なった。反応系は基質 0.1 ml, buffer 0.3 ml, 組織乳剤 0.1 ml とし、40°C に15分間放置後 10% TCA を 1.0 ml 注加し5分間水冷した。さらに水 1.0 ml を追加してから遠沈し、その上清 2.0 ml をとって King の方法<sup>6)</sup>によつて P 定量を行なった。反応開始時に TCA を加えた盲検を用意し、光電用磷標準液を用いて P 定量用標準グラフを作製し、遊離磷酸の P mg 量を計算した。

肝、脾の組織乳剤は乳鉢中で蒸溜水を媒液として10倍乳剤としたが、glucose-6-phosphatase 活性測定にはこれをそのまま 0.1 ml 使用し、酸性 phosphatase 活

性測定には acetate buffer を用いて、さらに10倍稀釈を2回施行し、それらの 0.1 ml を用いて活性測定を行なった。

脾中感染菌数の測定は、上記乳剤の一部を 1% NaOH を用いて10倍稀釈系列とし、これらの 0.1 ml ずつを小川鶏卵培地 ( $KH_2PO_4$  を原液に1%に含有する) に接種し、37°C 3週放置後の発生集落数より推定した。

#### 実験成績

実験 1: 前報告<sup>5)</sup>においては、G-6-P を基質とした場合に脾において活性はみられなかつたので、種々な器官における酸性 phosphatase 活性、G-6-Pase 活性を健康マウスを用いて検討した。

Table 1. Comparative Intensity of Acid Phosphatase Activity of Various Organs of Mice

Organ	Intensity of acid phosphatase activity in the presence of below-indicated substrate	
	Glucose-6-phosphate at pH 6.5	p-Nitrophenyl phosphate at pH 5.6
Spleen	—	卅
Liver	卅	卅
Kidney	卅	卅
Lung	—	卅
Muscle	—	+, —
Heart	—	+

Table 1 に脾、肝、腎、肺、筋肉、心臓における活性度を相対的な強度として示した。G-6-Pase は肝、腎においてのみ反応陽性で強い活性をもつていたが、一般酸性 phosphatase 活性は、脾、肝、腎、肺で強く、筋肉(大腿部筋)と心臓においてはきわめて微弱であつた。肝の G-6-Pase が肝実質細胞に由来することは、この細胞の生理的機能からみて当然であるが、pH 5.6 における酸性 phosphatase 活性は、Thorbecke ら<sup>4)</sup>によつて Kupffer 星細胞に限局していることが認められているので、この2種の酵素活性の測定によつて、肝における実質細胞と、網内系細胞の代謝活性の変化の一面を常に相互に対比しつつ検討できる。

実験 2: 各群 16 匹、16 匹、7 匹の3群のマウスを用意し、それぞれ対照群(非感染)、感染群、再感染群とした。感染群、再感染群は実験当初に Ravenel 株 0.1 mg の静注を受けたが、再感染群は感染2週目にさらに Ravenel 株 0.1 mg の再静注を受けた。対照群、感染群は感染直前および以後1週ごとに、再感染群は3週目と4週目に、それぞれ3匹ずつを剖検し、その肝と脾について酸性 phosphatase 活性を p-nitrophenyl phosphate を基質として測定した。そのさい臓器全体の重量をも計

Fig. 1. Elevation of Acid Phosphatase Activity (p-Nitrophenyl Phosphate as Substrate) of the Spleen and the Liver in Mice Infected and Reinfected Intravenously with 0.1 mg of Bovine Tubercle Bacilli (Ravenel)

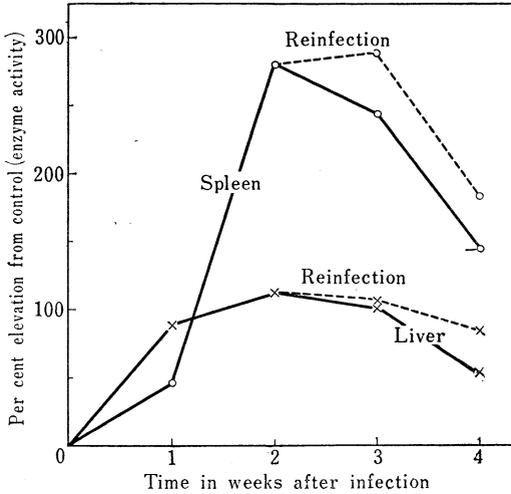
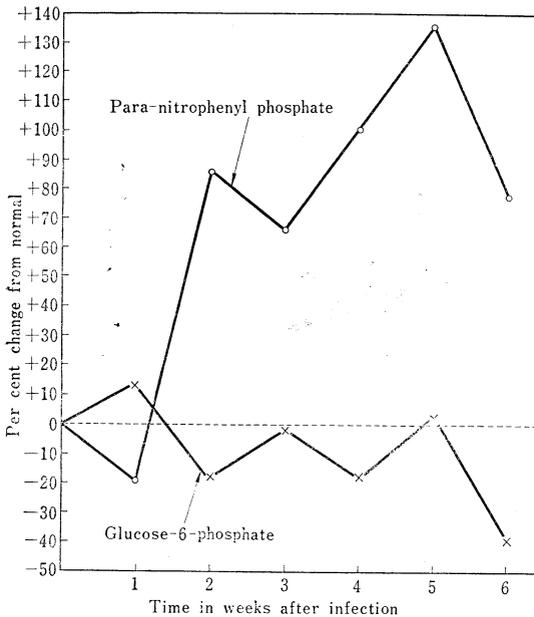
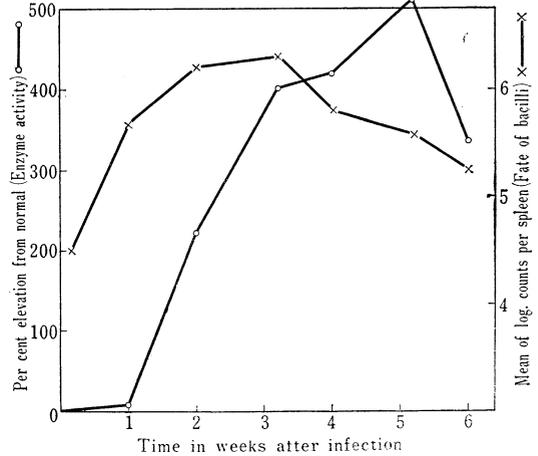


Fig. 2. Change of Acid Phosphatase Activity of the Liver in Mice Infected Intravenously with 0.05 mg of Bovine Tubercle Bacilli (Ravenel Strain)



量して活性度を全臓器としての値に換算し、対照群に対する%上昇率で表現した。成績を Fig. 1 に示した。感染後の活性度上昇は肝、脾ともに2週において極期を示しその後低下したが、しかし3週時、4週時においても感染群の活性度は脾においては対照群の約150%、肝

Fig. 3. Change of Acid Phosphatase Activity of the Spleen and the Fate of Tubercle Bacilli Thereat in Mice Infected Intravenously with 0.05 mg of Bovine Tubercle Bacilli (Ravenel Strain)



においては50%の上昇を示していた。再感染によつて活性度上昇の維持が多少延長される傾向を示したが、絶対的な影響は与えなかつたように思われた。

実験3：前報告<sup>5)</sup>を含めたこれまでの実験は、これから記載する実験3の予備観察であつて、ここに感染菌の消長追求を含めた総合的な実験を計画した。40匹の健康マウスを等半とし、一方の群のみ Ravenel 株の0.05 mg を用いて一様に静注感染し、感染群とした。

感染群の2匹は、感染直後の脾における感染菌数の培養測定のため剖検され、対照群の2匹については、実験出発時の肝酸性 phosphatase 活性、肝 G-6-Pase 活、脾酸性 phosphatase 活性測定のため剖検された。以後1週ごとに両群より3匹ずつを無差別に選んで殺し、それぞれ肝、脾の100 mg ずつを集めて乳剤として、肝における2種の酵素活性、脾における酸性 phosphatase 活性を前実験の要領で追求した。感染群の脾については感染菌数の培養試験をも行なつた。

成績は Table 2, Fig. 2, 3 に示した。感染群の体重は常に対照群に及ばないが、肝、脾の重量は逆に感染群が大であつて、ことに脾の腫脹が著しい。Table 2, Fig. 2 において明瞭であるが、感染によつて肝の酸性 phosphatase 活性は上昇するが、G-6-Pase はむしろ低下の傾向を不規則ながら示し、この両酵素活性の対照的な動きは、前報告での観察<sup>5)</sup> と同一であつた。脾に関しては Fig. 3 の示すごとく、酸性 phosphatase 活性は感染の進行に伴つて上昇したが、その極期は感染菌増殖曲線の峯より2週間ほど後にずれて5週目にあつた。また活性度上昇は感染2週目にはじめて明瞭となつてきているが、

Table 2. Change of Acid Phosphatase Activity of the Liver and the Spleen in Mice Infected with 0.05 mg of Bovine Tubercle Bacilli (Ravenel strain) Intravenously

Group	Time after infection (weeks)	Body weight (g)	Organ weight (mg)		Acid phosphatase activity : mcg (converted to whole organ value) of liberated phosphate P or PNP by below-indicated tissue		
			Liver	Spleen	Liver		Spleen
					G-6-P*	PNP-P**	PNP-P**
Immediately before infection		16.1	970	90	1,600	8,245	1,305
Control	1	19.6	1,330	97	2,793	11,970	1,503
	2	24.3	1,790	120	4,564	11,635	1,920
	3	25.3	1,670	120	4,926	10,855	1,560
	4	26.3	1,730	110	6,050	12,975	1,760
	5	25.0	1,400	100	5,040	11,200	1,500
	6	26.5	1,830	110	6,588	14,646	1,760
Infected	1	17.0	1,200	130	3,180	9,600	1,560
	2	19.3	2,070	350	5,382	21,735	6,125
	3	24.5	2,130	370	4,857	18,105	7,770
	4	22.0	2,000	380	5,015	26,000	9,120
	5	17.0	1,650	480	5,150	26,400	9,120
	6	21.5	2,000	450	4,000	26,000	7,650

Note: \* G-6-P (glucose-6-phosphate) at 40°C for 15 minutes.

\*\* PNP-P (p-nitrophenyl phosphate) at 40°C for 60 minutes.

これは Fig. 1 の場合と異なつて、はじめの感染菌数がより少なく、それに応じての細胞反応もおくれたものであろう。

## 考 察

結核感染と酸性 phosphatase 活性についての一般的な考察と、文献的概観は前報<sup>5)</sup>にゆずり、ここでは実験に直接関係した面についてのみ論ずることとする。

結核感染によつて網内系細胞の酸性 phosphatase 活性の上昇することは肝、脾についての上述の所見から、またこれまでの多くの研究者の報告<sup>7)~10)</sup>からみて確実な現象であろうが、その実態と生物学的意義は全く不明である。ここにいくつかの可能性をあげる。1) 喰菌された結核菌による活性が付加されているという可能性は別に報告の予定であるが、結核菌の酸性 phosphatase 活性は、マウス肝・脾組織にくらべればきわめて微弱で、これらの組織 0.1~0.5 mg の反応値に付加するとは考えられない。しかし生体内の結核菌は培養菌と異なりその活性が強いという可能性もある。これについては現在実験を計画中である。2) 次に、結核菌をとり入れた網内系細胞に特異的にこの酵素活性が上昇するという可能性であるが、これはさらに大別して二つの場合がある。一つは結核菌体、あるいはその代謝産物を処置するための酵素活性、他の一つは喰菌現象に必要なエネルギー獲得のため、燐を多量に遊離回転する要求上のうごき。3) 第3の可能性は、感染によつて酸性 phosphatase 活性

の強い細胞が選択的に増殖するというのであつて、これはこの酵素活性についての“heterogenous cell population”を前提とし、結核感染はこの population の内容に変化を与える役割を演ずるものである。われわれの実験においても、活性度は単位重量当りでも 150~200% 上昇し、さらに脾全体としても大きくなつていたので、この臓器の腫大は酸性 phosphatase 活性陽性細胞の選択的増殖によるとも説明されうるのであろう。このことは G-6-Pase 活性を同時に測定しうる肝においては、実質細胞を対照としての Kupffer 星細胞の選択的増殖であると、きわめて合理的な解釈が与えられる。しかし個々の網内系細胞内で酸性 phosphatase が量的に増加していないという保証もない。この点はこの酸素が誘導されるか否かの問題とも関連するが、またそれは lysosome に存在する“particulate enzyme”であるので、細胞化学的な検討からも論ずるべきであろう。

網内系酸性 phosphatase 活性上昇は、必ずしも結核感染にのみ特異な現象ではないが<sup>4)11)</sup>、BCG<sup>4)</sup>、H 37 Ra<sup>5)</sup>によるよりも、有毒株 H37Rv<sup>5)</sup>、Ravenel 株による感染の場合に活性は一そう顕著であり、また感染が平衡状態に入つて菌の増殖が停止すれば、活性は次第に正常に戻る傾向があるので、この酵素活性上昇は、結核感染における網内系の動態の一表現として受取れるのではなからうか。複雑な結核感染の動態は一方向からの検討のみでは捉えがたいので、いろいろな面に光を当てて、総合的にその全体像の理解にすむ必要がある。本報は、そ

のような試みの一環をなすものとする。

### 結 論

マウスにおいて、結核感染に伴う酸性 phosphatase 活性の変化を、肝および脾において観察し、かつ脾における感染菌数の消長との関係を検討した。肝実質細胞由来の glucose-6-phosphatase 活性はむしろ低下の傾向を示したが、網内系由来と考えられる一般酸性 phosphatase 活性は感染に伴って上昇し、菌の増殖曲線の峯より後にずれて最高上昇率を示した。しかし菌の分裂増殖が停止し、感染が平衡化するにつれて、活性は正常値に戻る傾向を表現した。この酵素活性上昇は、網内系細胞活性化の指標と考えられ、肝、脾の腫大はこの種の細胞の数の増加によつても説明される。

室橋部長のご校閲ならびに実験における田村恵子氏のご協力に感謝する。

### 文 献

- 1) 金井興美：医学と生物学, 65 : 18, 1962.
- 2) 金井興美：医学と生物学, 65 : 56, 1962.
- 3) 金井興美：医学と生物学, 65 : 93, 1962.
- 4) Thorbecke, G.J. et al.: J. Histochem. Cytochem., 9 : 392, 1961.
- 5) 金井興美・近藤瑩子：医学と生物学, 65 : 138, 1962.
- 6) King, E.J. et al.: Biochem. J., 26 : 292, 1932.
- 7) Grogg, E. and Pearce, A.G.E.: Brit. J. Exper. Path., 33 : 567, 1952.
- 8) Weiss, L.P. and Fawcett, D.W.: J. Histochem. Cytochem., 1 : 47, 1953.
- 9) Suter, E. and Hullinger, L.: Ann. New York Acad. Sci., 88 : 1237, 1960.
- 10) Allison, M.J. et al.: Am. Rev. Resp. Dis., 84 : 364, 1961.
- 11) Thorbecke, G.J. et al.: Federation Proc., 19 : 134, 1960.