

結核感染宿主の代謝の変動

第2報 結核マウスの NAD-ase

戸井田 一郎・安藤 文雄・山本 節子

結核予防会結核研究所 (所長 岩崎竜郎)

受付 昭和 41 年 12 月 26 日

BIOCHEMICAL STUDY ON THE HOST RESPONSE
TO TUBERCULOUS INFECTION*

2. NAD-ase of Tuberculous Mouse

Ichiro TOIDA, Fumio ANDO and Setsuko YAMAMOTO

(Received for publication December 26, 1966)

In the preceding paper (Amer. Rev. Resp. Dis., 94 : 625, 1966), one of the writers reported the elevation of NAD-ase activities of liver, kidney, spleen, and lung of guinea-pig infected with tubercle bacilli. In this paper, the metabolic changes of tuberculous mice were reported. Mice were infected with tubercle bacilli intravenously and enzymatic activities of their tissue homogenates were observed successively following the course of the infection. NAD-ase was assayed according to the method of Kaplan's KCN method. Acid phosphatase was assayed with *p*-nitrophenylphosphate as substrate. Succinate dehydrogenase was assayed with triphenyltetrazolium chloride as electron acceptor.

As shown in Fig. 1, the enhancement of NAD-ase activity was observed by tuberculous mice as well as tuberculous guinea-pigs, but the degree of the elevation was much less remarkable by the former than by the latter. Repeated experiments under the same experimental conditions gave the results with fairly good reproducibility as shown in Fig. 2. NAD-ase, acid phosphatase and succinate dehydrogenase activities were all enhanced by the tuberculous infection, but their variation patterns were linkely to be independent each other (Fig. 3 and 4). The degrees of metabolic changes were compared, after several strains of tubercle bacilli with different virulence were used for the infection. As shown in Fig. 5~7, the degree of metabolic enhancement were not found to be proportional to the degree of virulence.

From these experimental results, the writers discussed some plausible mechanism of NAD-ase enhancement by tuberculous infection. Also, the writers stressed the necessity to follow the whole course of the infection as possible to understand the biochemical changes of the infected host.

生化学的にみたとき、結核感染を受けた宿主は、特異的な抗体産生をもつて反応するほかにも、いろいろの代謝の変動を示すことが知られている。このうち nicotin-

amide adenine dinucleotide glycohydrolase(NAD-ase)の活性が上昇することについては Bekierkunst, Artman¹⁾ によつて報告され、われわれも結核に感染させた

* From the Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association, Kiyose Machi, Kitatama Gun, Tokyo, Japan.

モルモットの NAD-ase の変動について報告した²⁾。今回はマウスについての研究成績を報告する。

実験方法および材料

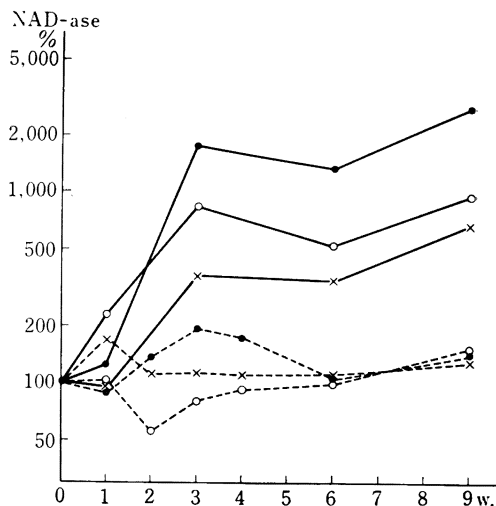
マウスは dd 系 (とくにことわらない場合は雌) の体重 20 g 前後のものを用いた。感染に用いた菌はとくにことわらないかぎり、人型結核菌 $H_{37}Rv$ 株であるが、いずれの菌も、ソートン合成培地表面培養 7~10 日目の菌を手振り法でガラス玉と振つて均等な菌液を作り (1 mg 湿菌量 per ml), その 0.2 ml をマウス尾静脈より静脈内に接種した。生菌数はこの条件で $13.0 \sim 5.6 \times 10^5$ の範囲内であつた。感染動物は日を追つて 1 回に少なくとも 5 匹ずつ、同数の非感染対照動物とともに腋窩動脈切断によつて失血死させ、ただちに肝、肺、脾をとり、10~50 倍容の蒸留水を加えて氷冷 Waring blender で、3,000 rpm 2 分間ホモジェナイズし、ガーゼ 2 枚重ねたものを通し、適当に希釈して酵素液とした。ホモジェネートの一部分をとつて 80°C で恒量になるまで乾燥して乾燥重量を求めた。同一条件でホモジェネートを調製した場合、臓器湿重量とホモジェネート乾燥重量と蛋白質含量との比率は、感染動物でも対照動物でもほぼ一定なので、蛋白質量の測定を略して乾燥重量を比活性計算の基礎とした。

NAD-ase 活性: 前報と同じ方法で²⁾, 0.1 M 磷酸バッファー (pH 7.0) 0.5 ml, 希釈ホモジェネート 0.2 ml, 水 0.2 ml, 10^{-2} M NAD 0.1 ml よりなる反応液を 37°C 30 分解置, 1.0 M KCN 5.0 ml を加えて反応を止め, 325 m μ で吸光度を測定, 同じ組成の反応液に零-time で KCN を加えたものの吸光度をブランク値とし, 吸光度の減少から, 加水分解された NAD の量を計算した。酵素比活性は μ moles (NAD 分解量) per hour per mg (乾燥重量) として計算した。

Acid phosphatase 活性: 0.1 M 酢酸バッファー (pH 5.6) 1.0 ml, 希釈ホモジェネート 0.1 ml, 0.02 M *p*-nitrophenylphosphate (disodium salt) 0.2 ml よりなる反応液を 37°C 30 分解置, 1% NaOH 2.0 ml を加え, 遊離した *p*-nitrophenol による黄色の発色を 420 m μ で比色定量した。同じ組成の反応液に NaOH を零-time で加えたものの値をブランク値とした。酵素比活性は μ moles (*p*-nitrophenol 生成量) per hour per mg (乾燥重量) として計算した。

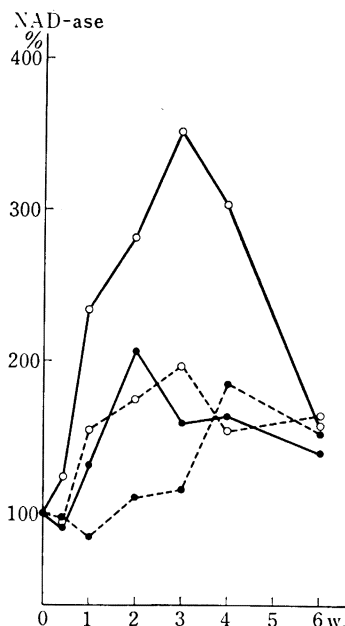
Succinic dehydrogenase 活性: 0.1 M 磷酸バッファー (pH 7.0) 0.5 ml, 肝ホモジェネート 1.0 ml, 0.1% triphenyltetrazolium chloride (TTC) 水溶液 1.0 ml, 0.2 M succinate (sodium salt) 0.5 ml よりなる反応液を 37°C 10 分解置し, アセトン 5.0 ml を加えて生成した formazan を抽出, 3,000 rpm 3 分遠沈した上澄の赤色を 480 m μ で比色して formazan を定量した。suc-

Fig. 1. Comparison of Guinea-pigs and Mice



Guinea-pigs and mice were infected with 0.2 mg (wet weight) of tubercle bacilli, $H_{37}Rv$, intravenously. NAD-ase activities of their lung (x—x), spleen (o—o) and liver (•—•) were assayed and compared with those of normal control animals. Straight lines: guinea-pigs, Dotted lines: mice.

Fig. 2. Reproducibility of NAD-ase Enhancement



Several independent experiments were repeated under the same conditions, and the two extreme results of these experiments were shown in the figure. Female dd strain mice were infected intravenously with 0.2 mg of tubercle bacilli, $H_{37}Rv$. NAD-ase activities of their lung and liver were assayed and compared with those of control animals.

• : lung, o : liver. — : Exp.1, : Exp.2.

inate の代りに水を加え、同様に処理したものの値をブランク値とした。酵素比活性は mcg (formazan 形成量) per 10 min. per mg (乾燥重量) として計算した。

実験結果

1) モルモットとマウスとの比較

この実験ではモルモット (体重 300~400 g) およびマウス (体重約 20 g) の雄を用い、 $H_{37}Rv$ の凍結乾燥標品を蒸留水に浮遊し、湿菌量で 0.2 mg に当たる量を静脈注射した。健康動物の NAD-ase 活性は、モルモットでは脾>肺>腎≒肝の順であり、マウスでは脾>肺≒肝の順で、モルモットの肺とマウスの脾、モルモットの肝とマウスの肺とで活性はほぼ等しい。感染による活性上昇の様相は、図 1 に示すようにモルモットとマウスとでかなり異なっており、すべての臓器についてモルモットはマウスに比して上昇の程度が著明であること、モルモットでは上昇した高い活性が長く持続するのに対し、マウスでは正常値に速くもどること、モルモットではどの臓器もほぼ似た傾向を示したのに対し、マウスは臓器ごとに変動の様相が異なり、とくに脾ではむしろ活性低下がみられたこと、などの差異が目玉された。

2) 再現性について

ddS 系マウス雌と $H_{37}Rv$ 株 Sauton 培養生菌という宿主-寄生体の組合せで、できるだけ条件を一定にして数回の実験を独立に行なつた結果を図 2 にまとめた。図には最もかけはなれた 2 つの例を示してあり、残りの実験の結果はこの 2 つのカーブの間に分布した。すなわち結核感染による NAD-ase 活性の上昇は、一定の実験条件下ではほぼ同じ様相で認められ、その上昇のピークでは肝では正常値の 2~3.5 倍、肺では正常値の約 2 倍となる。

3) 他の代謝系の変動との関連

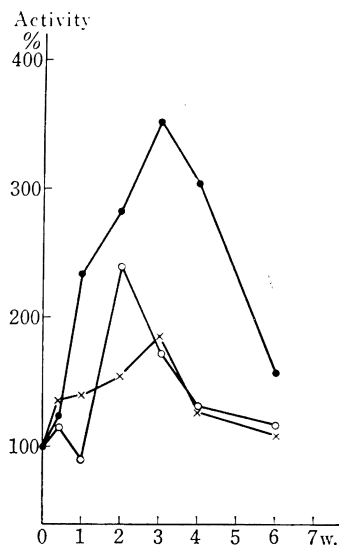
lysosomal enzyme の代表とされている acid phosphatase 活性と、mitochondrial enzyme である succinate dehydrogenase 活性の結核感染による変動を、NAD-ase の変動と平行して観察した。これらの代謝系も同一条件でくり返した実験から、NAD-ase の場合と同じ程度の再現性をもつて変動することが認められた。図 3, 4 に示したように、これら 3 つの代謝系は感染によつていずれも上昇し、ある程度の関連した変動を示したが、変動の程度やピークに達する時期にはかなりのずれがあり、完全に平行した変動ではなかつた。

4) 菌の毒力

$H_{37}Rv$, $H_{37}Rv$ を試験管内で 50 mcg INH per ml に耐性にした $H_{37}Rv$ -INH^r, BCG, 人型結核菌黒野株を用いて、できるだけ同じ条件で菌液を作り、黒野株の 0.4 mg (湿菌量)、その他の株の 0.2 mg (湿菌量) を静脈内接種した。この感染条件では BCG および $H_{37}Rv$ -

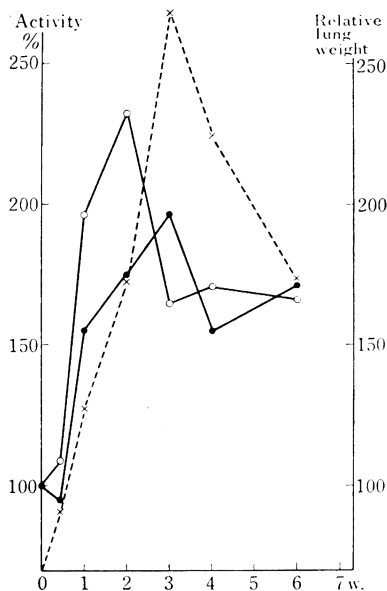
INH^r 感染では 9 週までに死亡はなく、 $H_{37}Rv$ では感染の第 4 週のうちに 13.5~27% が死亡し、黒野株では 10~21 日の間に全例が死亡した。また肺病変の程度を比

Fig. 3. Changes in Liver Metabolism



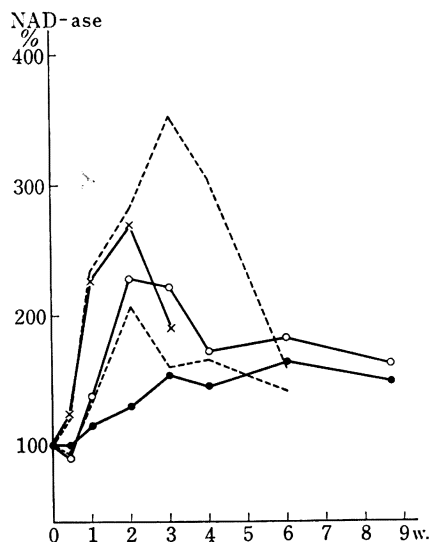
Female mice (dd) were infected with 0.2 mg. (wet weight) of tubercle bacilli, $H_{37}Rv$, intravenously, and their liver NAD-ase (●—●), acid phosphatase (○—○) and succinate dehydrogenase (x—x) activities were assayed and compared with those of control animals.

Fig. 4. Changes in Lung



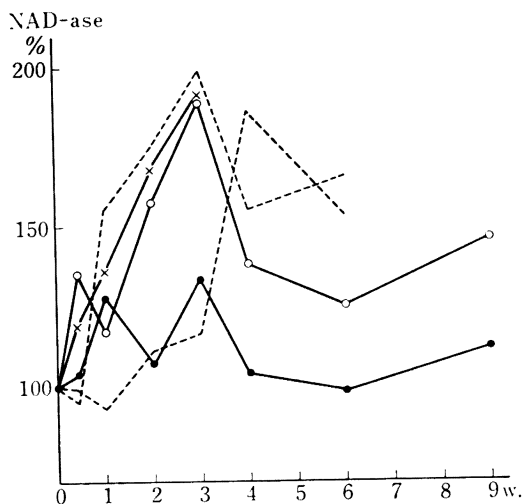
Female mice (dd) were infected with 0.2 mg. of tubercle bacilli, $H_{37}Rv$, intravenously, and their lung NAD-ase (●—●) and acid phosphatase (○—○) activities were assayed and compared with those of control animals. Their lung relative weight (lung weight per body weight) were also determined (x—x).

Fig. 5. Virulence and Liver NAD-ase



Female mice (dd) were infected with 0.2mg. (wet weight) of $H_{37}Rv$ (.....), of $H_{37}Rv$ -INHR ($\circ$ — $\circ$), of BCG ($\bullet$ — $\bullet$) or 0.4mg. of Kurono ($\times$ — $\times$). Liver NAD-ase activities were assayed and compared with those of control animals.

Fig. 6. Virulence and Lung NAD-ase

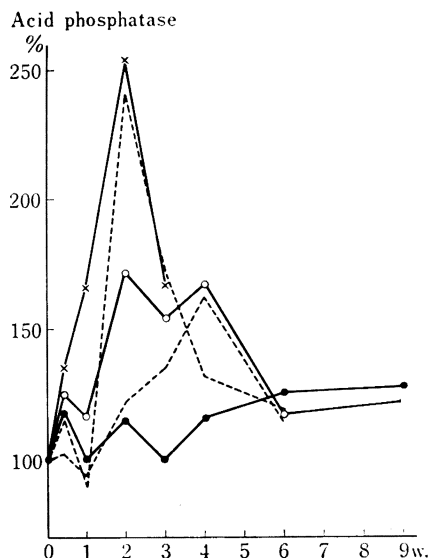


See, the footnote for Fig. 5. Lung NAD-ase activities were assayed and compared with those of control animals.

肺重でみると、感染後3週目で BCG 82.1, $H_{37}Rv$ -INHR 221.3, $H_{37}Rv$ 191.2~268.1, 黒野株 352.4 であった。

図5, 6に示したように、死亡率の高い黒野株感染の場合も、死亡のない $H_{37}Rv$ -INHR 感染の場合も、NAD-aseの変動の程度と様相とはあまり大きい差はなく、いずれも $H_{37}Rv$ による変動の範囲のなかで変動した。BCG 感染では肝、肺とも NAD-ase 上昇のピークは他の場合よりもかなり低く、対照群の130%程度に

Fig. 7. Virulence and Liver Acid Phosphatase



See, the footnote for Fig. 5. Liver acid phosphatase activities were assayed and compared with those of control animals.

すぎなかつた。

図7に示した肝の acid phosphatase の場合もほぼ同様のことが認められた。

考 案

前報²⁾ではモルモットについて結核感染による NAD-ase の上昇を報告したが、マウスでも肝、脾、肺の NAD-ase 上昇が認められた。体重差を無視して同量の結核菌を接種した場合、マウスの代謝変動はモルモットに比較してはるかに弱かつた。このことは両種の動物の結核に対する感受性の差を説明するうえでの一つの手がかりと考えられる。同様の現象はすでに Windman ら³⁾が報告している。

同一近交系、同一性別、同一体重、同一飼育条件の動物に、同一菌株、同一培養条件、同一菌量の菌を同一感染法で感染し、つねに非感染対照動物の代謝活性を対照として測定しながら実験をくり返した場合、活性上昇の時期や程度にはある程度の幅はあるにしても、この種の実験としては許される程度の再現性で NAD-ase の変動が認められた。しかし上昇の時期や程度には、同じ条件下での実験でも実験ごとにずれがみられ、また感染の経過に伴って動揺または正常値への回復もみられるので、いろいろの菌株による感染の比較、他の属の細菌感染との比較、あるいは結核菌のいろいろな菌体画分の作用の比較などの場合、注射量をどう設定するかの問題を別にしても、感染後のどの時点で観察するかによつて逆の結論になる可能性さえあり、この種の実験には感染の経過を追つて経時的に観察することが絶対的に必要であると

考えられる。

NAD-ase と併行して肝では acid phosphatase, succinate dehydrogenase 活性を、肺では acid phosphatase 活性と比肺重とを測定した。これらの変動の間にはある程度の関連はみられたが、完全に平行した動きではなかった。acid phosphatase は phagocytosis と関連して lysosome の機能を示すものとされており、succinate dehydrogenase は mitochondria にあつて electron transport system の一環であることが知られている。NAD-ase は一応 NAD レベルの調節に関与する酵素であるが、その生体内での機能と意義とは明らかではない。ある程度生物学的意義の明らかな代謝系と比較することによつて、結核感染における NAD-ase 上昇の意味を探り出そうとする試みは、必ずしも成功しなかったが、いくつかの代謝系が完全に平行して変動するのでないことから、代謝活性の高い新しい細胞の出現という現象のみによつて、これらの変動を説明しきれないことは明らかである。既存の細胞ないし細胞内機能単位の活性化と、高い活性をもつた新しい細胞の出現との複雑なからみ合いの結果としてこのような代謝活性の上昇が起こるものと考えられる。

acid phosphatase が結核感染によつて上昇することについてはすでに多くの文献があり（前報²⁾の引用文献参照）、われわれの実験結果もこれらとほぼ一致した。結核感染と succinate dehydrogenase 活性については、Chaudhuri ら⁴⁾はモルモットの腎では低下するが肝では軽度、脾では明らかに上昇、Kato ら⁵⁾はマウスの肝で低下、Allison ら⁶⁾はウサギ腹腔単核細胞でいったん低下し、のちに上昇、Bekierkunst ら⁷⁾はマウス肝で不変、Allison ら⁸⁾はヒトの末梢白血球で不変、Segal⁹⁾はマウス肝、肺で上昇とそれぞれ報告しており、結論はまちまちである。マウスの実験結核症で、加藤⁵⁾が TTC 法で活性低下を報告しているのに対し、われわれが同じ方法でむしろ上昇を認めたが、この差異はなによりも感染の強さの差異に原因するものと考えられる。さらに加藤^{10)~12)}がその後の系統的な研究で明らかにしているように受容体として tetrazolium、とくに TTC を用いることの方法的な欠陥によるものかもしれない。

毒力を異にするいろいろの菌株の感染による NAD-ase の変動を比較してみると、致死率や比肺重で表現される毒力の程度と代謝変動の程度との間には、はつきりした関連が認められなかった。マウスとモルモットの比較の場合、動物の感受性と代謝変動との間にある程度の

平行関係が認められたことと対比して考えると、同一の菌が異なる宿主に対して示す毒力の差と、いろいろな菌株が同一の宿主に対して示す毒力の差とは、一率に考えてはならないものかもしれない。

結 論

結核感染によつてマウスの臓器の NAD-ase 活性は上昇する。モルモットに比較するとこの上昇の程度は低い。NAD-ase の変動と acid phosphatase, succinate dehydrogenase 活性の変動との間には、ある程度の関連はみられるが平行関係は完全ではない。毒力の異なる菌による感染の場合、毒力と代謝変動の程度は必ずしも平行しない。

感染における宿主の代謝変動をみるとときには、感染条件を一定にする必要は当然として、感染の時間的推移を続時的に追及することが必要である。

この報告の一部分は第 41 回結核病学会総会（1966）、第 17 回結核化学研究グループ総会（1966）で発表した。

文 献

- 1) Bekierkunst, A., Artman, M.: Amer. Rev. Resp. Dis., 86: 832, 1962.
- 2) Toida, I.: Amer. Rev. Resp. Dis., 94: 625, 1966.
- 3) Windman, I.: Artman, M., Bekierkunst, A.: Amer. Rev. Resp. Dis., 91: 706, 1965.
- 4) Chaudhuri, S. N., Martin, S. P.: J. Exp. Med., 98: 99, 1953.
- 5) Kato, M., Miki, K., Matsunaga, K., Yamamura, Y.: Amer. Rev. Resp. Dis., 80: 535, 1959.
- 6) Allison, M. J., Zappasodi, P., Lurie, M. B.: Amer. Rev. Resp. Dis., 85: 364, 1962.
- 7) Bekierkunst, A., Artman, M.: Amer. Rev. Resp. Dis., 86: 832, 1962.
- 8) Allison, M. J., Gerszten, E., Brummer, D. L., Caster, S.: Amer. Rev. Resp. Dis., 91: 713, 1965.
- 9) Segal, W.: Archives of Biochem. Biophys., 113: 750, 1966.
- 10) 加藤允彦: 第 8 回結核化学研究グループ総会（1962）.
- 11) Kato, M.: Amer. Rev. Resp. Dis., 93: 411, 1966.
- 12) 加藤允彦: 私信.