

結核感染宿主の代謝変動

第3報 NAD-ase の活性上昇における生菌の意義

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42年2月23日

BIOCHEMICAL STUDY ON THE HOST RESPONSE TO
TUBERCULOUS INFECTION*3. Significance of Live Tubercle Bacilli to the
Metabolic Changes of Host

Ichiro TOIDA, Fumio ANDO and Setsuko YAMAMOTO

(Received for Publication February 23, 1967)

Female mice were injected with 0.2 mg of live or heat-killed tubercle bacilli, H₃₇Rv, intravenously, and NAD-ase, acid phosphatase and succinate dehydrogenase activities of liver and lung were followed. As shown in Fig. 1~3, the enzymic activities of the animals infected with live bacilli were remarkably enhanced as already reported in the preceding papers, but those of the animals injected with heat-killed bacilli did not show any enhancement, but, on the contrary showed some decrease.

As shown in Tables 1 and 2, neither of the animals injected with carbon particles nor those injected with sheep red cells showed the metabolic changes as observed after tuberculous infection.

The characteristic metabolic changes after tuberculous infection, especially the enhancement of NAD-ase activity, were suppressed by the treatment with cortisone (0.25 mg. daily), as shown in Fig. 4 and 5.

From these experimental results, the significance of live bacilli to the metabolic changes of host were discussed.

結核感染を受けた宿主臓器の Nicotinamide adenine dinucleotide-glycohydrolase 活性 (NAD-ase 活性) が上昇することについては, Bekierkunst, Artman¹⁾ の報告以来多くの報告があり^{2)~7)}, われわれもモルモット⁸⁾ およびマウス⁹⁾ について, 結核動物の NAD-ase の活性上昇を報告した。しかし結核感染のさいにどのような機構で NAD-ase 活性が上昇するのか, あるいは NAD-ase 活性の上昇が結核症の成立と進展のうえにどのような意味をもっているのか, などの点については全く明らかにされていない。われわれはこの問題の解明の第一歩

として, NAD-ase の活性上昇のために生きた結核菌の感染が必要条件であるかどうか, そしてそれが十分条件かどうかを主眼として検討した。すでにモルモットについては, 死菌注射や脂質粗分画あるいは脱脂菌体の注射では NAD-ase の上昇が起こらないことを報告したが⁸⁾, 今回はマウスについての実験結果を報告する。

実験材料と方法

実験動物にはすべて dd 系雌マウスの体重 20 g 前後のものを用い, 固型食餌と水とを自由に摂食させて飼育

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

した。感染に用いた菌は人型結核菌 $H_{37}Rv$ 株で, Sauton 合成培地に 7~10 日培養したものを手振り法で水晶玉と振つて 1 mg (湿菌量) per ml の均等な菌液とし, その 0.2 ml をマウス尾静脈より注射した。生菌数は 5.6×10^6 にあたる。加熱死菌はこれと同じ菌液を 100°C 沸騰水浴中で 30 分間加熱し, ついで室温まで冷却, 再び振盪して均一な菌液にしたもので, 同じく 0.2 ml を尾静脈より注射した。羊赤血球は市販の Alsever 液保存血液を, 使用にさいして生理的食塩水で 3 回洗滌し, 5×10^6 per ml になるように生理的食塩水に浮遊したもので, その 0.2 ml を尾静脈より注射した。墨粒子にはドイツの Günther Wagner 社製 pelican 印 india ink (粒子の径は 200~500 Å) を用い, 蒸留水で 5 倍に希釈してその 0.2 ml を尾静脈より注射した。マウス 1 匹当り約 3.2 mg にあたる。

cortisone 投与の場合には cortisone acetate (Upjohn 社製) を蒸留水で 10 倍に希釈して 2.5 mg per ml の浮遊液とし, その 0.1 ml を感染前日より毎日, 背部皮下に注射した。この場合の対照動物としては菌を感染させずに cortisone 注射のみを行なったものをあてた。

それぞれの実験開始後 3 日, 7 日, 14 日, 21 日, 28 日, 42 日, 63 日目に, 1 群少なくとも 5 匹ずつの動物を同数の対照動物と平行して, 腋窩動脈切断によつて失血死させ, ただちに肝, 肺をとり, それらの酵素活性を測定した。

NAD-ase, acid phosphatase, succinate dehydrogenase 活性の測定は前報⁹⁾と同じ方法によつた。

実験結果

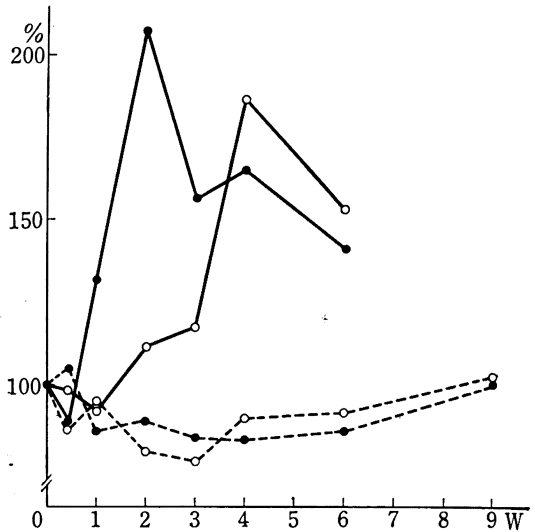
1) 生菌と死菌。同じ重量の結核菌生菌と加熱死菌とを注射したときの NAD-ase 活性の変動を図 1 に, acid phosphatase 活性の変動を図 2 に, succinate dehydrogenase 活性の変動を図 3 に示した。

NAD-ase 活性は生菌感染後, 肝では 1 週後, 肺では 2 週後から活性上昇を示し, 2~4 週目で最高の活性に達したのち徐々に低下するが, 6 週後もなお対照動物の 140%, 150% の高い活性を示したのに対し, 死菌注射の場合には 1 週後から逆に活性は低下し, 実験終了のときまで肝では 10~15%, 肺では 10~25% 対照動物よりも低い活性を示した。

acid phosphatase, succinate dehydrogenase の活性も同様に死菌注射の場合は生菌感染のときのような活性上昇を示さず, 逆にある程度の低下傾向を示した。

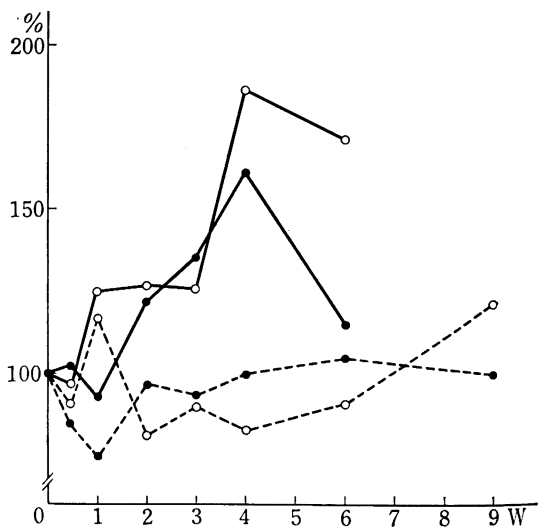
2) 羊赤血球と墨粒子。結核菌感染に伴う NAD-ase 活性の変動が, 単なる異物の貪食に伴う現象かどうかをみるために, 単純な異物として墨粒子, 抗原性をもつ異物として羊赤血球を選び, これらをマウスに静注したときの酵素活性の変動をみた。

Fig. 1. NAD-ase Activities after Injection of Live or Heat-Killed Tubercle Bacilli



Female mice were injected with 0.2mg of live or heat-killed tubercle bacilli, $H_{37}Rv$, intravenously. NAD-ase activities of liver and lung were measured by the method of Kaplan. The activities of the experimental animals were compared with those of the control animals and expressed as % of the latter.
● : Liver, ○ : Lung, — : Injected with live bacilli, : Injected with heat-killed bacilli.

Fig. 2. Acid Phosphatase Activities after Injection of Live or Heat-killed Tubercle Bacilli

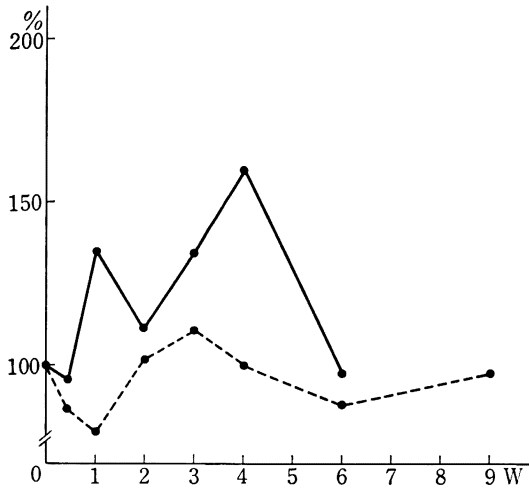


Female mice were injected with live or heat-killed tubercle bacilli, $H_{37}Rv$, of the wet weight of 0.2mg intravenously. Acid phosphatase activities of liver and lung were measured with p-nitrophenylphosphate as the substrate. The activities of the experimental animals were compared with those of the control animals and expressed as % of the latter.
See, the footnote for Fig. 1, also.

表1および2に示したように、NAD-ase 活性は対照動物の130~80%の範囲で動揺したが、羊赤血球注射後3週目の肝NAD-aseの活性低下、墨粒子注射後3週目

の肺NAD-aseの活性上昇が統計的に対照動物に対して有意の変動とみなされたほかは、有意の変動とは認められず、いずれにせよ結核菌感染の場合のような著明な活性上昇はなかつた。

Fig. 3. Succinate Dehydrogenase Activities after Injection of Live or Heat-killed Tubercle Bacilli



Liver succinate dehydrogenase activities of female mice, injected with live or heat-killed tubercle bacilli (0.2 mg wet weight) intravenously, were measured with TTC as hydrogen acceptor. The activities of the experimental animals were expressed as % of that of the control animals. See, the footnote for Fig. 1, also.

acid phosphatase の場合も表3および4に示したように、対照動物の125~75%の範囲で動揺したが、羊赤血球注射後6週目の肝の活性上昇、墨注射後3日目の肺の活性低下、9週目の肝の活性低下のほかは統計的に有意の変動とは認められなかつた。

肝の succinate dehydrogenase は墨注射後2~4週に、羊赤血球注射後3週に軽度の活性低下を示したが、いずれも統計的に有意な変動とは認められなかつた。

3) cortisone の影響。感染動物に cortisone acetate を毎日 5 mg 皮下注射したときは、8~10日の間に全例が死亡した。非感染動物に cortisone acetate を毎日 0.25 mg 皮下注射したときは、実験期間中体重の増減なく、脾の萎縮はとくに実験初期で著しく、脾重量平均値は各剖検時点で 63.9, 62.4, 60.4, 74.2, 98.4, 107.8, 100.8 mg であつた。感染動物に cortisone acetate を毎日 0.25 mg 皮下注射したときには、体重は実験期間中に約 10% 減少し、脾重量および肺重量の増加は感染一非注射動物の場合に比較して著しく軽度で、感染一非注射動物の脾重量は最高 500 mg をこえ、比肺重は4週目で最高値 235.7 に達したのに対し、感染一注射動物では脾重量平均値は各剖検時点で 97.0, 119.6, 250.8,

Table 1. Liver NAD-ase Activity after Injection of Carbon Particles or Sheep Red Cells

Animals	3 days	1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks	6 weeks	9 weeks
Control	0.948 ±0.148	0.839 ±0.160	0.624 ±0.159	0.667 ±0.125	0.721 ±0.102	0.589 ±0.153	0.694 ±0.208
Carbon-injected	0.817 ±0.115	0.865 ±0.094	0.683 ±0.067	0.539 ±0.177	0.670 ±0.180	0.716 ±0.091	0.703 ±0.138
SRC-injected	0.862 ±0.172	0.825 ±0.120	0.661 ±0.227	0.489* ±0.121	0.695 ±0.075	0.672 ±0.055	0.824 ±0.122

Female mice (dd strain) were injected with 10⁸ sheep red cells or about 3.2 mg of carbon particles intravenously. Liver and lung NAD-ase activities were determined according to the method of Kaplan and expressed as micromoles of NAD cleaved per hour per mg of tissue dry weight.

* Statistically significant (p<0.05)

Table 2. Lung NAD-ase Activity after Injection of Carbon Particles or Sheep Red Cells

Animals	3 days	1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks	6 weeks	9 weeks
Control	0.693 ±0.140	0.651 ±0.175	0.702 ±0.128	0.482 ±0.102	0.526 ±0.053	0.982 ±0.113	0.603 ±0.177
Carbon-injected	0.634 ±0.119	0.593 ±0.114	0.727 ±0.153	0.664* ±0.058	0.517 ±0.119	0.947 ±0.107	0.654 ±0.237
SRC-injected	0.742 ±0.108	0.751 ±0.130	0.768 ±0.124	0.617 ±0.152	0.490 ±0.156	0.864 ±0.081	0.811 ±0.361

See, the footnote for Table 1.

* Statistically significant (p<0.01)

Table 3. Liver Acid Phosphatase Activity after Injection of Carbon Particles or Sheep Red Cells

Animals	3 days	1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks	6 weeks	9 weeks
Control	4.299 ±1.190	4.437 ±0.615	6.084 ±1.397	4.145 ±0.736	5.738 ±0.290	4.101 ±0.415	5.338 ±0.198
Carbon-injected	3.813 ±0.412	4.494 ±0.546	5.247 ±0.575	4.164 ±0.352	5.766 ±0.462	3.570 ±0.580	4.201* ±0.199
SRC-injected	3.955 ±0.147	5.008 ±0.589	5.305 ±1.140	4.897 ±0.580	5.679 ±0.479	5.157* ±0.465	5.144 ±0.548

Female mice (dd strain) were injected with 10^6 sheep red cells or about 3.2 mg of carbon particles intravenously. Liver and lung acid phosphatase activities were determined with p-nitrophenylphosphate as the substrate and expressed as micromoles of p-nitrophenol formed per hour per mg of tissue dry weight.

* Statistically significant ($p < 0.01$)

Table 4. Lung Acid Phosphatase Activity after Injection of Carbon Particles or Sheep Red Cells

Animals	3 days	1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks	6 weeks	9 weeks
Control	1.586 ±0.208	1.846 ±0.439	1.821 ±0.102	1.669 ±0.285	1.636 ±0.256	1.640 ±0.378	1.308 ±0.107
Carbon-injected	1.282* ±0.152	1.388 ±0.176	1.895 ±0.352	1.744 ±0.173	1.966 ±0.331	1.741 ±0.238	1.337 ±0.132
SRC-injected	1.660 ±0.180	2.084 ±0.583	2.006 ±0.424	1.753 ±0.097	1.521 ±0.295	1.640 ±0.198	1.452 ±0.199

See, the footnote for Table 3.

* Statistically significant ($p < 0.05$)

358.0, 266.4, 288.4, 238.0 mg と変化し, 比肺重は徐々に増加して 9 週目で最高値 160.2 に達した。

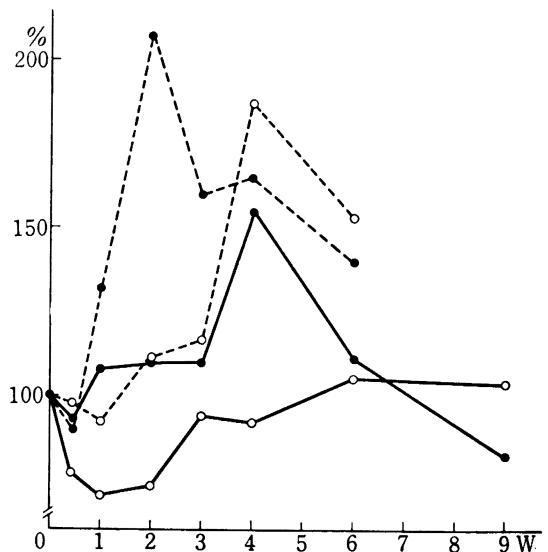
非感染動物の NAD-ase 活性は cortisone 注射によって著しい影響を受けないが, 感染動物に cortisone 注射を行なった場合には, 図 4 に示したように感染に伴う NAD-ase の変動の様相は著しい影響を受ける。すなわち感染—注射動物の肝 NAD-ase は 4 週目に軽度の上昇 (非感染—注射動物の 150%) を一過性に示したのみであり, 肺 NAD-ase 活性は感染直後よりかえって低下し (対照動物の 70%), 3~4 週ごろに対照動物のレベルにもどつたが, 実験期間中活性上昇はみられなかつた。

acid phosphatase 活性も非感染動物では cortisone 注射によつて著しい影響を受けなかつたが, 感染動物に cortisone を注射した場合は, 図 5 に示したように感染 3 週ごろまではあまり影響されなかつたが, それ以後の時期の活性上昇は cortisone によつて抑えられた。

考 案

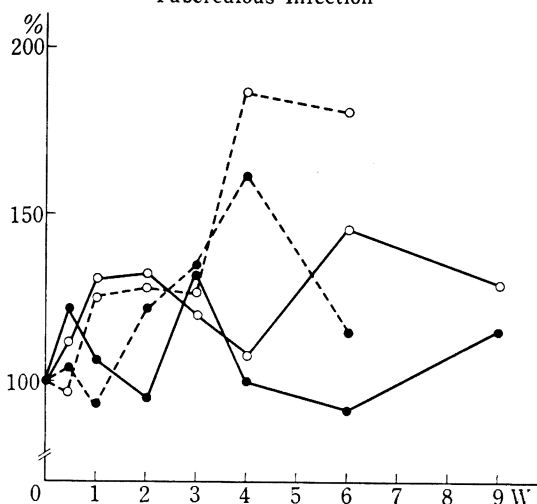
さきにモルモットについて報告したのと同じく, マウスでも結核死菌注射の場合には生菌感染の場合のような NAD-ase の活性上昇は認められず, むしろ逆に低下の傾向がみられた。Artman ら¹⁰⁾はマウスに cord factor を注射すると肝, 肺, 脾の NAD-ase 活性が上昇すると報告しているが, かれらの用いた cord factor を全菌体に換算すると莫大な量になり, われわれの結果との不一致は注射量の差によるものかもしれない。しかし生菌感

Fig. 4. Influence of Cortisone on the Change of NAD-ase Activity after Tuberculous Infection



Female mice were infected with 0.2 mg of tubercle bacilli, $H_{37}Rv$, intravenously, and the half of the infected animals were injected with 0.25 mg of cortisone acetate intramuscularly every day from the day before the infection. Half of the non-infected control animals were treated with cortisone in the same way. NAD-ase activities of liver and lung were measured by the method of Kaplan. The activities of the cortisone-treated, infected animals were expressed as % of those of the cortisone-treated, non-infected animals, and the activities of the non-cortisone-treated, infected animals were expressed as % of those of the non-cortisone-treated, non-infected animals. ●: Liver, ○: Lung, —: Cortisone-treated,: Non-cortisone-treated.

Fig. 5. Influence of Cortisone on the Change of Acid Phosphatase Activity after Tuberculous Infection



See, the footnote for Fig. 4. Acid phosphatase activity was measured with p-nitrophenylphosphate as the substrate.

染の場合は 0.01 mg の菌量でも程度は低いながらも明らかな活性上昇が起こるので、生菌と死菌に対する生体の反応の差異は、生菌が生体内で増殖する結果として死菌と量的に差ができることによるものとは考えられない。死菌注射によつて NAD-ase 活性の上昇がみられないことから、感染に伴う NAD-ase の上昇は、正常の生体に菌体の特定の成分が導入されたために一次的に起こる現象でないといえるが、遅延性過敏症の生体ではどうか、換言すれば生菌は生体感作する役割と感作された生体に特定の菌体成分を提供する役割とを二重に果たしているのではないかという疑問は残る。感作動物に再び生菌または死菌（あるいは菌体成分）が侵入したときの NAD-ase の変動については目下検討中である。

墨粒子を生体に注射すると、細網内皮系細胞によつて貪食され急速に流血中から消失し、長期間食細胞中に止まる。羊赤血球も同じく細網内皮系細胞に貪食されるが、ここで消化分解される一方、抗体産生系を刺激して赤血球凝集抗体や溶血抗体を産生させる。このようにタイプの異なる異物をマウスに注射したとき、どちらの場合も結核菌生菌感染の場合のような NAD-ase の活性上昇はみられなかった。すなわち結核感染に伴う NAD-ase の上昇は、結核菌の単なる異物作用あるいは顆粒性抗原としての作用によるものではない。結核症に特異的な現象か、感染症一般にみられる現象なのかについては今後の検討を予定している。

cortisone は肝および肺の NAD-ase 活性自体にほとんど影響しないにもかかわらず、感染に伴う NAD-ase の活性上昇をほぼ完全に抑えた。cortisone がマウス実

験結核症に及ぼす影響については多くの研究があり（文献 11 参照）、cortisone 投与によつて生体側の細胞反応が減弱する一方、菌の組織内増殖は旺盛になるとされている¹¹⁾。菌の増殖は cortisone によつて盛んになるにもかかわらず、cortisone 投与によつて感染に伴う NAD-ase の活性上昇が抑えられることから、NAD-ase の活性上昇には、組織内での結核菌増殖という条件は十分な条件ではないといえる。cortisone が生体に与える影響としては、蛋白質合成の阻害、lysosome の安定化、リンパ系細胞の増殖抑制などがあげられているが、このどの機序によつても NAD-ase の上昇抑制を説明することは可能であり、したがつて逆に cortisone の影響を受けるということから NAD-ase 活性上昇の機構を一義的に推定することはできない。NAD-ase の細胞内局在性に関しては、Windman ら⁵⁾は Microsome に局在すると報告しているが、その報告では De Duve の提唱した lysosome の概念¹²⁾について十分な考慮が払われておらず、NAD-ase が lysosome 酵素である可能性は否定されてはいない。われわれはあらためてこの点の検討を行なつており別に報告する¹³⁾。lysosome と関連して興味を惹くのは、代表的な lysosome 酵素である acid phosphatase は、感染初期の上昇は cortisone によつてほとんど影響されずに上昇するが、のちの時期の上昇は cortisone によつて抑制される点である。おそらく感染に伴う代謝変動は、感染の全経過を通じて単一の機構で起こるのではなく、その相に応じて種々の機構によつて同一の現象が惹き起こされるのであつて、したがつて cortisone に対する感受性も相によつて異なるのであろう。

結 論

結核菌加熱死菌、墨粒子、羊赤血球をマウスに静脈注射した場合、結核菌感染のときにみられるような NAD-ase の活性上昇は認められなかった。したがつて NAD-ase の活性上昇のためには、組織内での菌の増殖が必要条件である。しかし cortisone 注射により菌の増殖は旺盛になるにもかかわらず、NAD-ase 活性上昇は抑制されるので、組織内の菌増殖は必要条件ではあつても十分条件ではない。菌の増殖が引き金になつて宿主側が反応し、既存の細胞の活性化または活性の高い新しい細胞の出現によつて、NAD-ase の上昇が起こると考えられる。この場合の引き金として、結核菌体成分、粒子状異物、顆粒状抗原などは無効である。

この報告の一部分は第 41 回日本結核病学会総会（1966）および第 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) Chaudhuri, S. N., Suter, E., Shah, N. S., Martin, S. P.: *J. Exp. Med.*, 117 : 71, 1963.
- 3) Bekierkunst, A., Artman, M., Silman, N.: *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 89 : 575, 1964.
- 4) Windman, I., Bekierkunst, A., Artman, M.: *Bioch. Biophys. Acta*, 82 : 405, 1964.
- 5) Windman, I., Artman, M., Bekierkunst, A.: *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 91 : 706, 1965.
- 6) Gopinathan, K. P., Sirsi, M., Vaidyanathan, C. S.: *Biochem. J.*, 94 : 446, 1965.
- 7) Shah, N. S., Mathur, P. P., Martin, S. P.: *Bioch. Biophys. Acta*, 117 : 263, 1966.
- 8) Toida, I.: *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 94 : 625, 1966.
- 9) 戸井田一郎・安藤文雄・山本節子: *結核*, 42 : 137, 1967.
- 10) Artman, M., Bekierkunst, A., Goldenberg, I.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 105 : 80, 1964.
- 11) 青木正和: *結核*, 34 : 228, 1959.
- 12) de Duve, C.: *Ciba Foundation Symposium "Lysosomes"*, p. 1, 1963 (J. & A. Churchill, Ltd., London).
- 13) 戸井田一郎・安藤文雄: 第42回日本結核病学会にて発表.