

原 著

結核病巣内の mononuclear phagocytes の酵素活性,  
特に  $\beta$ -galactosidase および naphthol AS-D acetate esterase の変動

津 田 富 康

熊本大学医学部第1内科  
熊本大学保健管理センター

鬼塚 徹・安藤正幸・志摩 清・徳臣晴比古

熊本大学医学部第1内科

受付 昭和 53 年 4 月 28 日

CHRONOROLOGICAL CHANGES IN ACTIVITIES OF VARIOUS ENZYMES  
INCLUDING  $\beta$ -GALACTOSIDASE AND NAPHTHOL AS-D ACETATE  
ESTERASE OF THE MONONUCLEAR PHAGOCYTES  
IN TUBERCULOUS LESIONSTomiyasu TSUDA\*, Toru ONIZUKA, Masayuki ANDO,  
Kiyoshi SHIMA and Haruhiko TOKUOMI

(Received for publication April 28, 1978)

Chronorological changes in the activities of various enzymes of the mononuclear phagocytes (MN) in tuberculous lesions were studied histochemically to estimate the functions of MN at the stages of development and healing of the lesions *in vivo*. Dermal BCG lesions were produced in rabbit by the intradermal injection of BCG and the lesions were biopsied at various times after infection. The enzymes assayed were  $\beta$ -galactosidase, acid proteinase (cathepsin D like), hyaluronidase, Naphthol AS-D acetate esterase, acid phosphatase, succinic dehydrogenase and cytochrome oxidase. The MN stained  $\ddagger$  to  $\#\#$  by each enzyme were designated as positive cells.

The activities of  $\beta$ -galactosidase, acid proteinase, hyaluronidase and esterase in MN varied by the stages of the lesions, *i. e.*, the activities of the former three which were mostly found in the MN localized near to necrotic areas increased at the stage of development two to four week after infection and there after gradually diminished. The latter one, *i. e.*, the activities of Naphthol AS-D acetate esterase were increased prominently in the MN of the healing lesions five to six weeks after infection.

The cells with increased activities of the esterase gathered in multiple masses which are not concerned with necrotic areas or in all the areas of the granulation. The activities of acid phosphatase, succinic dehydrogenase or cytochrome oxidase were found evenly in the MN of any stage and were neither correlated with development nor healing of the lesions.

Based on the studies of BCG lesions in rabbits at the stages of development and healing,

\* From the first department of internal medicine, Kumamoto University Medical School 1-1-1, Honjo, Kumamoto 860 Japan.

human tuberculous lesions including a 7 days BCG lesion induced in a normal individual, a tuberculin reaction tested for patient with pulmonary tuberculosis and lymphnodes biopsied from patients with tuberculous lymphadenitis were also studied by using the same histochemical methods. Only the cells with the activities of Naphthol AS-D acetate esterase showed similar behavior to the MN in experimental BCG lesions.

In this paper, the significance of the Naphthol AS-D acetate esterase increase in MN at the stages of healing are discussed from the viewpoints of the healing mechanisms of tuberculous lesions.

## はじめに

結核病巣に集まる mononuclear phagocytes (以後  $M\phi$  と記す) には数多くの酵素活性<sup>1)~4)</sup> が認められおり、その酵素活性は組織内環境の変化や炎症催起物質の種類により変動している。われわれは今までに lysosomal enzyme である  $\beta$ -galactosidase を  $M\phi$  の marker enzyme とし、かつ *in vivo* で label された tritiated thymidine grains の  $M\phi$  内での推移を調べて結核病巣に集まる  $M\phi$  の機能と動態を検討し報告<sup>5)6)</sup> して来た。しかし  $\beta$ -galactosidase が lysosomal enzyme である関係上、この酵素を使用することは初期より成熟期の結核病巣での  $M\phi$  の機能と動態を解析するには便利であつたが、治癒期病巣における  $M\phi$  の機能の解析には不十分なところがあつた。今回報告する naphthol AS-D acetate esterase はこの点結核病巣治癒期の  $M\phi$  に急速に増加してくること、この期はほとんど新しい流入細胞のない時期であることを合わせ考えると結核病巣治癒期の  $M\phi$  の機能と密接に関係していることが推測され、結核病巣治癒期の病態の解析に役立つ酵素と考えられたのでここに報告し、その意味するところを検討した。

## 実験方法

研究材料: ニュージーランド白色ウサギ5匹の背部皮内に日本 BCG 製造株式会社の BCG を 0.4 mg/lesion の割合に接種、1匹当り8コの病巣を作り経時的に3, 7, 14, 21, 28, 35, 42病日にその体積を測定、各病日に1病巣を切除し半切、その一部は凍結保存他の一部は10%ホルマリンで固定パラフィンにて包埋した。また各病日前48時間に注射された tuberculin に対する反応局所も同時に切除し凍結保存およびパラフィン包埋ブロックを作つた。

また34歳男性肺結核患者の前腕内側に接種した tuberculin に対する48時間目の反応局所と、38歳健康男性の上腕皮内に接種した BCG 病巣(7日目)、および2名の頸部リンパ節結核患者のリンパ節も切除後に凍結保存した。

染色法: 以上凍結保存した種々の組織をクリオスタットで  $8\mu$  の凍結切片にし、また組織化学法で染色の場合はスライドクラス上で乾燥固定後、 $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -Gal), acid phosphatase (Acid-P), alkaline phosphatase (Al-P), naphthol AS-D acetate esterase (AS-D ES), succinic dehydrogenase (SD), および cytochrome oxidase (CO) を染色した。また substrate film 法を使用した際には凍結切片を substrate film 上で軽度冷風で乾燥させたのち、acid proteinase (cathepsin D) (Acid-Pro) は Cunningham の法<sup>7)</sup> で、hyaluronidase (H-ase) は Szemplinka 法<sup>8)</sup> の変法で調べた。

パラフィン包埋切片はヘマトキシリンエオジンにて染色し形態学的変化を観察した。

## 酵素活性の判定

各病日に切除した tuberculin 反応局所に集まる  $M\phi$  の染色状況は各病日も変化がなく一定であつたのでこの  $M\phi$  のもつ酵素活性を基にそれ以上になつたものを強陽性  $M\phi$  とみなし卅~卍に分け判定した。また substrate film 法を使つた場合は陽性細胞の数と消化された film の領域より一~卍までに分けて判定した。

## 成 績

1. 酵素活性の推移: 経時的に病巣内  $M\phi$  の酵素活性を調べると、 $\beta$ -Gal, Acid-Pro, H-ase, AS-D ES などの酵素群は BCG 病巣の病期と深い関係で変動している。そして  $\beta$ -Gal, Acid-Pro, H-ase は Table 1, Table 2 に示すごとく BCG 病巣の初期(3, 7病日)に弱く最盛期(14, 21, 28病日)に強陽性  $M\phi$  が多数出現してきて治癒期(35, 42病日)に再び減少していく傾向が認められた。そしてこれらの強陽性  $M\phi$  の病巣内分布を調べると Photo 1 に示すように壊死巣に接した部位に強い強陽性  $M\phi$  が認められ、それより遠ざかるにつれて弱い活性を示す細胞が分布していることがわかつた。しかし substrate film 法を使用した際には組織化学法を使用した場合より、film の消化領域より判定する関係上やや判定困難な場合もあつた。

次に AS-D ES の変動を調べると Table 1, Fig. 1 に示すように初期にはほとんど強陽性 Mφ は出現してこず、最盛期でも平均 15.5±2.5%に強陽性 Mφ を認めるにすぎない。これに反し治癒期に入ると急速に強陽性 Mφ が出現してきて、35 病日で 49.0±4.3%、42 病日で

38.9±7.2%と約半数の Mφ が強陽性に变化してくることがわかった。そこで AS-D ES 強陽性 Mφ の局在を調べると最盛期の病巣ではほぼ散在性に存在しや肉芽外側に多く存在していたが、治癒期になると Photo 2 に示すように急速に酵素活性の変化を来し肉芽全体が、あるいはその内部が島状に、強陽性 Mφ で占められてきた。

これに対し Table 2 に示すように Acid-P, Al-P SD, CO などでは各病期を通じおのおのの細胞にはそれほどの酵素活性の差を示さなかつた。しかし Acid-P はやや個々の細胞で酵素活性に差が認められたが β-Gal ほどの差は認められなかつた。

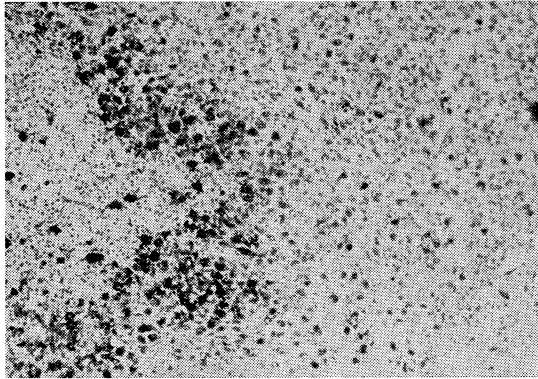


Photo 1. β-Galactosidase activity in epithelioid cells of 14 days tuberculous granulation. 150×

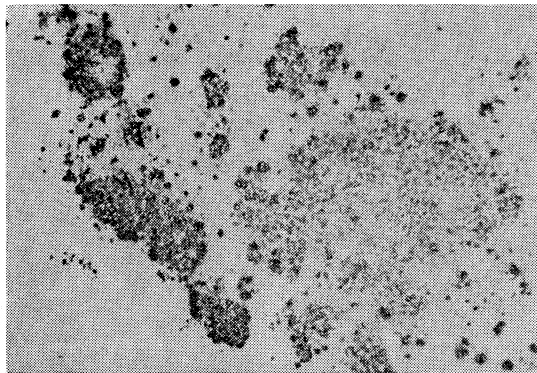


Photo 2. Naphthol AS-D acetate esterase activity in epithelioid cells of 35 days tuberculous granulation. 150×

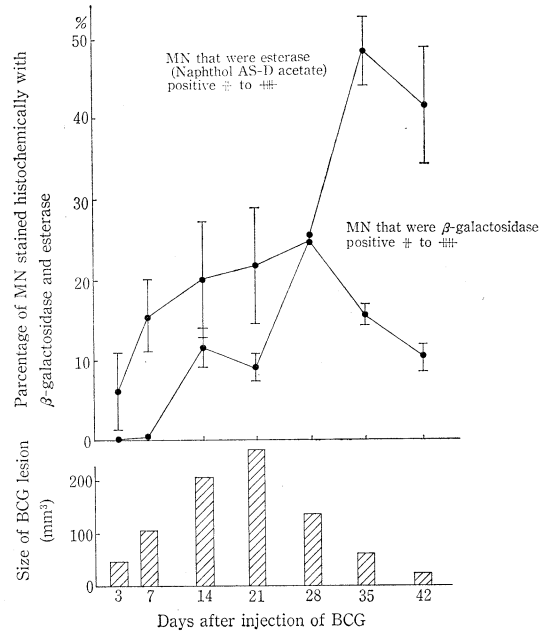


Fig.1. Chronological changes in enzyme activity of MN in BCG lesions.

Table 1. Chronological Changes in Enzyme Activities of Mononuclear Phagocytes at Dermal BCG Lesions (I)

Days after injection of BCG	Number of rabbits used	Naphthol AS-D-acetate esterase		β-galactosidase	
		Percentages of mononuclear phagocytes showing		Percentages of mononuclear phagocytes showing	
		-~+	++~###	-~+	++~###
3	4	100 ± 0	0 ± 0	93.8 ± 4.8	6.2 ± 4.8
7	4	99.2 ± 0.2	0.8 ± 0.2	84.3 ± 4.8	15.7 ± 4.8
14	4	88.3 ± 2.5	11.7 ± 2.5	79.7 ± 7.6	20.3 ± 7.6
21	4	91.0 ± 1.6	9 ± 1.6	77.2 ± 7.3	22.2 ± 7.3
28	4	74.1 ± 3.7	25.9 ± 3.7	74.6 ± 4.5	25.4 ± 4.5
35	4	51.0 ± 4.3	49.0 ± 4.3	84.2 ± 1.3	15.8 ± 1.3
42	4	61.1 ± 7.2	38.9 ± 7.2	89.5 ± 1.2	10.5 ± 1.2
Tuberculin reaction sites (48 hr)	4	100 ± 0	0 ± 0	95.0 ± 2.5	5.0 ± 2.5

Table 2. Chronological Changes in Enzyme Activities of Mononuclear Phagocytes at Dermal BCG Lesions(II)

Days after injection of BCG	By substrate film method		By histochemical method				
	Hyaluronidase	Acid-proteinase	Acid-phosphatase	Alkaline-phosphatase	Cytochrome-oxidase	Succinic-dehydrogenase	
3	±	—	+	—	±	+	+
7	+	+	+	—	±	+	+
14	++	++	++	—	±	+	+
21	++	+++	++	—	±	+	+
28	++	++	++	—	±	+	+
35	++	++	+	—	±	+	+
42	++	+	+	—	±	+	+

Table 3. Esterase and  $\beta$ -galactosidase Activities of Epithelioid Cells in Tuberculous Granulation

	Tuberculin reaction	Dermal BCG lesion	Lymphadenitis tuberculosa	
	(Skin)	(7 days)	Case I	Case II
$\beta$ -galactosidase	— ±	— ±	— ±	— ±
Naphthol-AS-D acetate esterase	+	± +	++	++
Acid phosphatase	+	+ ++	+ +++	++

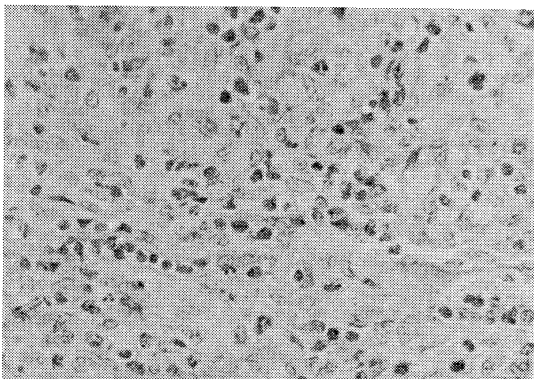


Photo 3. Epithelioid cells interdigitated tightly were seen in 14 days tuberculous granulation. HE 300×

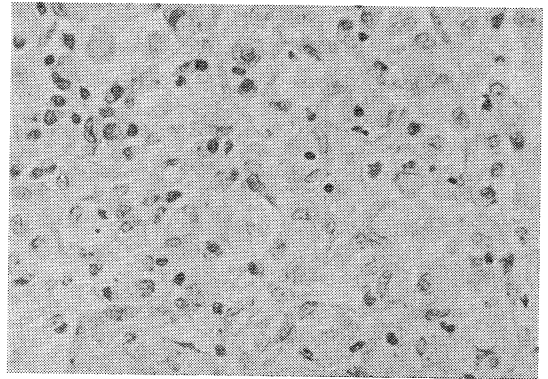


Photo 4. Many of epithelioid cells become balloon like cells with maldistributed nucleus and dissociation of intracellular space in 42 days tuberculous granulation. HE 300×

2. 形態学的変化: HE 染色標本で BCG 病巣内細胞の形態学的変化を調べると初期にはいまだ細胞質の発育の悪い中心核をもつ  $M\phi$  が多数のリンパ球や多核球と混在して存在していたが最盛期になると Photo 3 のごとく密に集合しお互いに相接する  $M\phi$  は強く接合していた。またこれらの  $M\phi$  は初期のそれよりも細胞質に富み核はやや局在し類上皮細胞の形態を示してくる。次に治癒期になると Photo 4 に示すように類上皮細胞は急に細胞質に富んだ一見 balloon cell 様となり細胞間結合は解離し核は極端に辺在するようになり、そしてなか

には変化した細胞も認められるようになった。

3. 人結核病巣の酵素活性: ウサギの BCG 病巣での解析を基礎として人の結核病巣と tuberculin 反応局所および BCG 病巣の  $M\phi$  について  $\beta$ -Gal, AS-D ES, Acid-P 活性を調べたのが Table 3 であるが,  $\beta$ -Gal についてはウサギと異なり非常に酵素活性が弱くほとんど陰性か弱陽性の細胞のみが認められた。次に AS-D ES 活性では tuberculin 反応局所や7日目の BCG 病巣で弱く, 結核性リンパ節炎で強い活性細胞が認められた。このことはウサギの実験と考え合わせ病期が AS-D

ES 活性に重要であることを示していた。次に Acid-P の動態を調べたが tuberculin 反応局所, BCG 病巣, 結核性リンパ節炎でも強弱はあるがほぼ同程度の活性値がおのおの Mφ に認められた。このこともウサギの実験と同じ結果を示していた。

## 考 案

慢性の肉芽腫の発生と治癒の過程を調べることはこれら疾病の難治性とその後に起こる種々の線維化の問題を解決するのに重要である。そこで今回は結核症という原因の明らかな病気で起こる肉芽腫が正常の過程で治癒に向かつていく過程を特に病巣内 Mφ の酵素を中心に調べてみた。結核病巣に集まる Mφ の酵素は大別して2つの酵素群がある。1つは酵素活性が個々の細胞で非常に異なる群と他は個々の細胞にあまり著明な差がない群とである。そして β-Gal に代表される多くの lysosomal enzymes は前者に属している。これに対し SD や CO に代表される非 lysosomal enzymes や Acid-P のように lysosome に局限していない酵素群が後者に属している傾向にある。

現在, lysosomal enzymes の活性化は, 炎症局所の起炎物質やその組織崩解産物の phagocytosis<sup>3)4)</sup>の結果起こる場合と, 結核症などのごとく感作リンパ球より出る lymphokines<sup>9)</sup>によって活性化が誘導されたり, また, 直接リンパ球が Mφ に接することによって活性化<sup>10)</sup>されるとされているが, その他にも多くの活性化の機序があるものと考えられている。

前記の理由から lysosomal enzymes は初期病巣で活性値が弱く, 遅延型過敏反応の現れる最盛期に細胞の流入の増加とともに個々の細胞の酵素活性が増加し, necrosis に接したところに強い活性値を示す Mφ が位置していることが多い。そして治癒期になると再び細胞の流入が減少し, 酵素活性も減少していくパターンが認められるものである。そしてその代表的酵素が β-Gal である。ところが AS-D ES の場合は初期病巣でほとんど強陽性 Mφ は認められず, 最盛期でもわずかに認められるのみで, 治癒期に至って初めて多数の Mφ が急速に強陽性 Mφ へと変わっていく。この点は β-Gal やその他の lysosomal enzymes と非常に異なるところで, それらの酵素とは活性化の機序がまったく異なつた酵素と考えられる。

末梢血単球の nonspecific esterases を示標とした研究<sup>11)12)</sup>で, 末梢血単球には, その成熟とともに活性値の増強する naphthol AS acetate esterase (AS ES) と, 成熟とともに減少してくる naphthol AS-D chloroacetate esterase (AS-D-Chl ES) が区別されており, またわれわれ<sup>13)</sup>は BCG 病巣を使用し, 病巣内に集まる Mφ の nonspecific esterases (AS ES, AS-D Chl ES, AS-D

ES, naphthyl acetate esterase (α-Naph ES)) 活性の推移を経時的に調べたが, 今回報告する AS-D ES 以外の3種の nonspecific esterases はほぼ β-Gal と同様病巣最盛期に酵素活性が増強してくるパターンを示していた。次に同上の4種の nonspecific esterases について種々の inhibitors の効果を調べたわれわれ<sup>13)</sup>の実験では, AS-D ES は他の3種の nonspecific esterases と異なり trypsin inhibitors<sup>14)</sup>で強く抑制されていた。また NaF では α-Naph ES を除く3酵素が程度に差はあるが抑制された。以上のほか, pentoxifylline<sup>15)</sup>も使用したが4種の酵素とも抑制は認められなかつた。以上の結果より AS-D ES は trypsin-like esterase と考えられた。

次に以上の酵素学的変動を基に Mφ の形態を調べてみると, AS-D ES 強陽性細胞は治癒期 BCG 病巣内に多数認められ形態的には baloon cell 様細胞と変化している。しかしこの期には細胞内に lysosome の増加は認められず, また新しい Mφ の流入もほとんどないことを考えると, この baloon cells は治癒期病巣で, 最盛期に認められた類上皮細胞が次第に変化して生じたもの, すなわち一種の細胞変性の過程を示すものと考えられた。しかし治癒期病巣には histiocytes をはじめ多くの細胞の存在が推測されるので, 今後これら Mφ 以外の細胞についても検討を要するものと考えている。

今日 nonspecific esterases は個々にその働きが解明されておらず, Mφ の nonspecific esterases についても同様である。最近 serine esterase<sup>14)16)</sup>や phosphodiesterase などは Mφ の機能と密接な関係で働いていることが証明されつつあり, われわれもそれら酵素を念頭において AS-D ES を検討したが今までに Mφ 固有の trypsin-like esterase であることが明らかとなつた。そこでこの AS-D ES が治癒期の BCG 病巣における Mφ の機能と何らかの関係があるものと考え現在追求中である。

次に以上の実験結核症のデータを基に人の結核病巣について β-Gal, AS-D ES, Acid-P の3酵素について検討した。β-Gal は人皮膚病巣では非常に Mφ の活性値が低く判定できなかつた。AS-D ES ではツ反病巣や BCG 病巣で弱く, リンパ節病巣で活性値を示す類上皮細胞を多数認めた。このことは実験結果より推測して同酵素が病期と強い関係にあることを証明している。次に Acid-P であるが人組織と動物組織で大差なく同じパターンで働く酵素と考えられる。

## 結 論

1) BCG 病巣内の Mφ についてその酵素活性を調べると病期とともに動き, 個々の細胞の酵素活性が非常に差を示すものと, 個々の細胞にあまり差を示さない2群の酵素がある。

2)  $\beta$ -Gal に代表される lysosomal enzymes は個々の  $M\phi$  で酵素活性に差があり強い活性値を示す細胞は壊死巣に接した部位に多く認められる。また強い活性値を示す細胞の出現は最盛期に最高となる。

3) AS-D ES は  $\beta$ -Gal 同様に個々の細胞で酵素活性に差が認められるが強い活性値を示す細胞の出現は治癒期の病巣で最高となる。このことは治癒期における  $M\phi$  の機能と関係があるものと考えられる。

#### 文 献

- 1) Yarborough, D.J., Meyer, O.T., Dannenberg, A.M., Jr. and Peason, B.: J. Reticuloendothel. Soc., 4 : 390, 1967.
- 2) Dannenberg, A.M., Jr., Bruston, M.S., Walter, P.C. and Kinsley, J. W.: J. Cell Biol., 17 : 465, 1963.
- 3) Rojas-Espinosa, O., Dannenberg, A. M., Jr., Steinberger, L.A. and Tsuda, T.: Am. J. Pathol., 74 : 1, 1974.
- 4) Tsuda, T., Dannenberg, A.M., Jr., Ando, M., Rojas-Espinosa, O. and Shima, K.: J. Reticuloendothel. Soc., 16 : 220, 1974.
- 5) Ando, M., Dannenberg, A.M., Jr. and Shima, K.: J. Immunol., 109 : 8, 1972.
- 6) Dannenberg, A.M., Jr., Ando, M. and Shima, K.: J. Immunol., 109 : 1109, 1972.
- 7) Cuningham, L.: Histochem. Cytochem., 15 : 296, 1967.
- 8) Szemplinska, H., Sierakowska, H. and Shugar, D.: Acta Biochim. Pol. : 9 : 239, 1962.
- 9) Mackaness, G. B.: Progress in Immunology (First International Congress of Immunology). Edited by B. Amos, New York, Academic Press, Inc., p.413, 1971.
- 10) Ando, M., Suga, M., Shima, K., Sugimoto, M., Higuchi, S., Tsuda, T. and Tokuomi, H.: Infect. Immun., 13 : 1442, 1976.
- 11) Schmalzl, F. and Braunsteiner, H.: Klin. Wschr., 46 : 642, 1968.
- 12) Meuret, G., Bammert, J. and Hoffman, G.: Blood, 44 : 801, 1974.
- 13) Tsuda, T.: in preparation.
- 14) Remold, H.G.: J. Immunol., 112 : 1571, 1974.
- 15) Hayashi, S. and Ozawa, H.: Chem. Pharm. Bull., 22 : 587, 1974.
- 16) Musson, R. A. and Becker, E.L.: J. Immunol., 118 : 1354, 1977.