

原 著

実験的結核病巣における蛋白分解酵素の研究

富野 郁子・山村 好弘・前田 秀夫
小川 弥栄・鈴木 末広

国立療養所刀根山病院

受付 昭和 54 年 3 月 12 日

STUDIES ON THE PROTEOLYTIC ACTIVITY
IN EXPERIMENTAL TUBERCULOSISIkuko TOMINO*, Yoshihiro YAMAMURA, Hideo MAEDA,
Yasaka OGAWA and Suehiro SUZUKI

(Received for publication March 12, 1979)

In order to clarify the correlation between the tuberculous cavity formation and the proteolytic enzyme activity in the pulmonary tissue, we have studied the autolytic proteolysis in the experimental tuberculous lesion which was formed by the injection of the heat killed H_37Rv into rabbit lungs.

Conclusions are summarized as follows:

1. The proteolytic activity in tuberculous lesion was several times higher than that in normal lung tissue.
2. The lung weight and the total proteolytic activity of the lung were increased according to the development of pathological changes after the intrapulmonary injection of bacilli, and decreased during the recovery processes.
3. The above phenomena were amplified and accelerated by the presensitization treatment, and were depressed by the sequential i.v. injection of PPD.
4. Although there are many kinds of proteases in the tuberculous lung, the lysosomal thiol protease in the alveolar macrophages should be playing the important roles in this tissue.
5. A new thiol protease, which was little activity in normal lung tissue, was found markedly in the tuberculous lesion and in alveolar macrophages as well.

はじめに

われわれは結核菌 ($H_{37}Rv$) の加熱死菌を家兎肺に注射すると、生菌注射同様に結核病巣および空洞が形成されることより、この空洞形成は菌体成分中に含まれる Lipid Protein Mixture (LPM) によって惹起されるアレルギー反応であることを明らかにしてきた¹⁾。

一方、近年細胞内プロテアーゼの研究はとみに進展し、ライソゾーム以外のミトコンドリアに存在するプロテア

ーゼが、勝沼ら²⁾ によつて発見され、その病態生理学的研究も進められている。また各種炎症においては、ブラディキニン-カリクレイン系の関与、あるいは補体結合反応系におけるプロテアーゼの働きと炎症成立機構との関係を報ずる研究も多くなつてきている。しかし肺結核における特異肉芽、乾酪壊死、空洞形成という特殊なプロセスは、細胞免疫および Delayed Hypersensitivity の関与とともに、急性炎症の場とは異なる特殊なプロテアーゼの存在することも考えられねばならない。

* From the Toneyama National Hospital, Toyonaka-City, Osaka 560 Japan.

すでに Dannenberg, Jr.³⁾, 金井⁴⁾らは肺結核におけるカテプシンDをはじめとするライソゾーム酵素の上昇を報告しており, 仁土⁵⁾は肉芽腫における肺胞マクロファージのライソゾーム酵素の増加と, ライソゾーム顆粒からの酵素分泌について電顕学的な研究をすすめている。

結核病巣の軟化融解のメカニズムは複雑なものであるが, この解明に蛋白分解酵素, 特にライソゾームプロテアーゼの研究は, 欠くことのできないものの一つであると考えられる。

われわれは結核死菌を家兎肺に注射して実験的に作成した結核病巣を用いて, その蛋白分解酵素活性を測定したのに, その値は, 正常肺と非病巣部分では大差を見出せないのに反して病巣部分は非病巣部の数倍に上昇していることを明らかにした。更に, この病巣部分の蛋白分解活性を検索するうちに, 正常肺や非病巣部にはほとんど存在しない酵素で, 病巣部または肺胞マクロファージに存在する新しいチオールプロテアーゼを発見し, 部分精製で1,000倍近く比活性の上昇した酵素を得ている。

この新プロテアーゼの諸性質については, 別報にゆづり, ここでは結核病巣における蛋白分解反応について報告したい。

実験材料と方法

実験動物は家兎(体重 2.5~3.5 kg)を使用した。

1. 感作: 結核菌 ($H_{37}Rv$) 加熱死菌 2.5 mg (乾燥重量) を家兎の大腿筋に週1回ずつ4週間接種し, その後1週間放置した動物を用いた。

2. PPD 静注処置: 結核菌肺内注射の1週間前より, PPD 1 mg/kg を週3回静注し, 5週間継続した。

3. 結核病巣の作成: 上記1, 2の動物および無処置の家兎に, $H_{37}Rv$ 加熱死菌 2.5 mg (乾燥重量) を流動パラフィン-ラノリン-アラセル基剤 2 ml に懸濁し, 肺内に注射した。対照群としては正常家兎にパラフィンのみを肺注したものをを用いた。

4. 酵素活性測定法: ①酵素標品: イソゾール麻酔下に家兎肺を取り出し, 肉眼的に病巣部, 非病巣部に分離し, おのおの1 g を 0.25 M 蔗糖液 9 ml でホモジェナイズし, ドライアイス-アセトン中で凍結融解を5回繰り返したものを使用した。②蛋白分解酵素活性測定法: 0.05 M Citrate Buffer, pH 5.0, 10 mM Di-thiothreitol (DTT) Enzyme (1.0~3.0 ml), Total 4 ml で37°C インキュベートし, 経時的に5% TCA 上清に遊離するアミノ酸を液体ニンヒドリン法によつて測定した。活性値はグリシンをスタンダードとして1時間に遊離するグリシンの μ mole 相当量をもつて表現した。③人工基質によるプロテアーゼ性活測定法: 0.1 M Citrate Buffer, pH 4.0; 1 mM EDTA; 2 mM DTT; 5 mM AA₃ME (Acetyl tri-Alanine Methyl Ester), Enzyme (0.1~0.5 ml); Total 1.0 ml とし,

37°C 20~60分反応後ヒドロキシルアミン, $FeCl_3$ 反応⁷⁾によつて基質の残存量を測定し, 最初の基質を30分間に50%分解する酵素量を 1.0 unit (u) として表現した。

基質として AA₃ME の代わりに BAEE (Benzoyl DL-Arginine Ethyl Ester) を使用したときは 0.1 M Citrate Buffer pH 6.0 を使用し, 同様にして測定を行なつた。しかし BANA (Benzoyl DL-Arginine β -Naphthyl Amide) を基質に用いた場合は Barrett⁸⁾ の方法に従い, 10分間反応後の溶液を発色させ O.D. 520 $m\mu$ の吸光度を30分値に換算して活性を表現した。④蛋白定量法: Cu-Folin 法によつて測定し, 蛋白 1 mg 当りの酵素活性値を特に比活性 (Specific Activity=S.A.) として表現した。

5. 肺胞マクロファージの採取: Myrvik⁹⁾ の方法によつた。

なお基質, 試薬はシグマおよび半井薬品を使用し, 蛋白分解酵素阻害剤 (Elastinal, Leupeptin Chymostatin) は, 微生物化学研究所の青柳博士より分与されたものを使用した。

実験成績

1) 正常肺および結核肺における蛋白分解活性

前項3により, $H_{37}Rv$ 加熱死菌を家兎に肺注すると1週間後には肺に大きさ 10 mm×10 mm 約 1 g の結核病巣の形成をみる。この肉芽組織とその周りの非病巣部および正常肺の各 1 g をそれぞれホモジェナイズして酵素標品とし前記4—②の方法によつて, 各時間ごとに5% TCA 上清に遊離するアミノ酸量を測定したものが Fig. 1 である。この図のごとく, アミノ酸の遊離量は時間との間に直線関係を示し時間とともに遊離アミノ酸量は増大する。Fig. 1 は各組織 10 mg (湿重量) 当りの値であるが, 正常肺 (Normal Lung), 非病巣部 (Outside of Lesion) に比べて, 病巣部 (Lesion) の蛋白分解能は明らかに上昇している。

2) 結核病変の消長と肺重量の変化

山村, 小川⁶⁾は結核感作動物に結核死菌の肺注を行なうと, 非感作動物に肺注を行なつた場合より病変の発現が早く, かつ拡大されること, また逆に正常動物に, PPD, TAP 等を静注しながら結核死菌を肺注すると病変の発現が抑制されることを報告した。そこで Fig. 2 に示すように, 家兎を4群に分け1週間ごとに各群動物を1匹ずつ屠殺し, その肺重量を測定した。

第1群は正常動物に結核死菌を肺注した群, 第2群は感作動物に結核死菌を肺注した群, 第3群は正常家兎に結核死菌肺注の1週間前より PPD を週3回5週間にわたつて静注を行なつた群(以下 PPD 処置という), 第4群は対照としてパラフィンオイルのみを肺注したものである。

Fig. 3 の縦軸は, 肺重量 (g) を体重 (g) で除し, 100

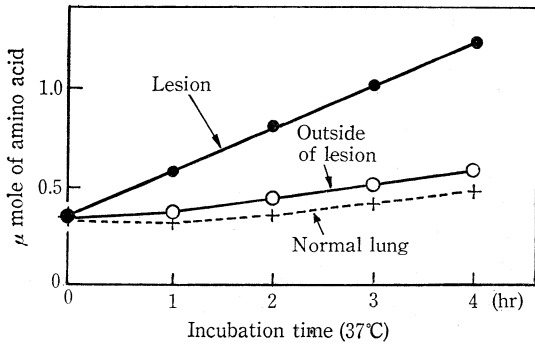


Fig. 1. Time course of amino acid liberation of autolytic proteolysis in lung tissues homogenate.

Intrapulmonary inj.
of heat killed $H_{37}Rv$ (2.5 mg)

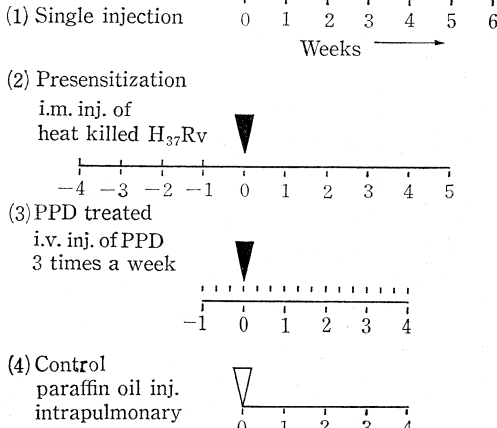


Fig. 2. Experimental schedule.

倍した値である。第1群では、肺注後1週間では肺重量は変化を示さないが、2週目から上昇を来し、3週間では対照群のその2.5倍に達した。これに比べて第2群は、肺注後3日で肺重量はすでに2倍に近い値を示し1~3週で3.5倍に達する。しかし第3群では、3週目における1.5倍が最高で、それ以上は増加しない。この事実は結核加熱死菌の肺注によつて生ずる病変が、結核感作、あるいは PPD 処置によつて修飾され、そのことが肺重量に反映されていることを物語っている。

3) 結核病変と蛋白分解活性

上記の4群の動物 (Fig. 2 参照) より、それぞれに肺をとり出し、おのおのの病巣部と非病巣部に分割して重量を計測し、次いで各群動物肺の病巣部と非病巣部の適量をホモジネートとして別々に蛋白分解活性を測定して、この値を病巣部および非病巣部の全重量の値に換算し、この両者の和を各群動物の肺全組織の酵素活性値として図示したのが Fig. 4 である。

Fig. 3 および Fig. 4 にみられるように、各群動物の肺全体の酵素活性の強弱と肺重量の変化とは比較的良好

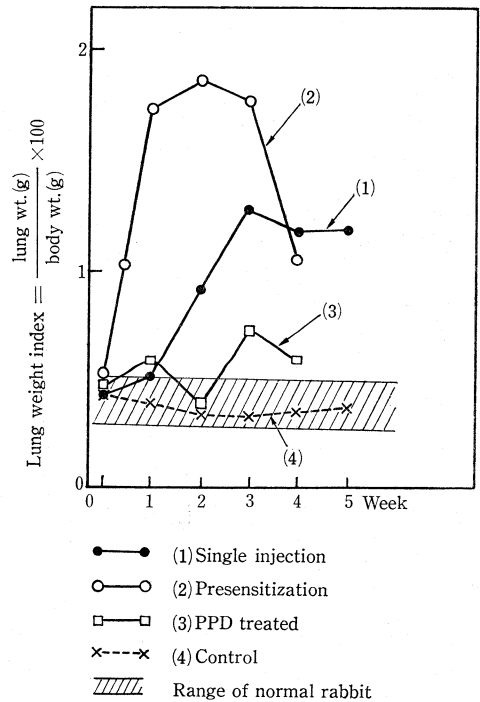


Fig. 3. Changes in the lung weight of the rabbits treated variously as shown in Fig. 2.

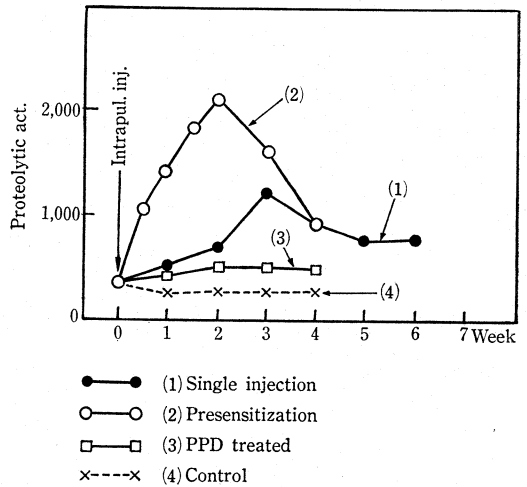


Fig. 4. Changes in proteolytic activity of whole lung of the rabbit treated variously as shown in Fig. 2.

平行している。すなわち第1群における酵素活性は、結核死菌肺注後1週間で10~20%ぐらゐの上昇を示し2~3週にかけて、正常肺の10倍近い高値をとる。3週をすぎると酵素活性も肺重量と同様に減少傾向がみられる。第2群においては、肺注後3日にして10倍近く上昇し、2週間では20倍近い値を示す。一方第3群においては酵素活性の上昇は弱く、3~4週後にわずかに2倍程度に上昇するにすぎない。

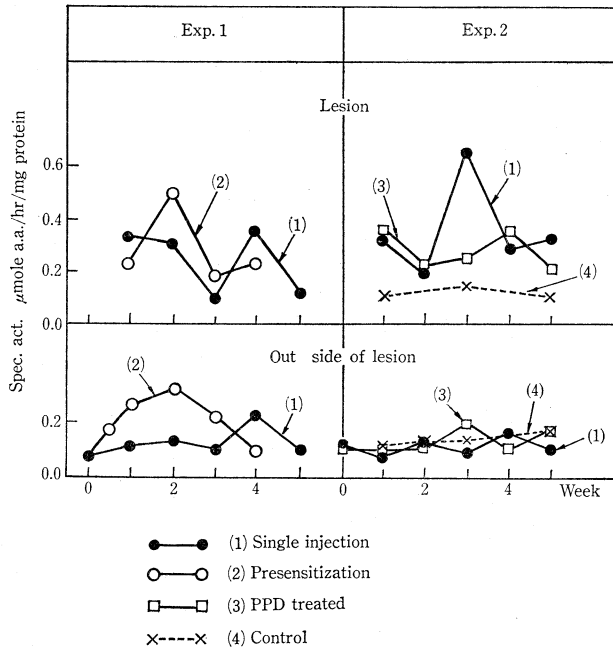


Fig. 5. Changes of specific activity of proteolysis in the lung of the rabbits treated variously as shown in Fig. 2.

このように蛋白分解活性も肺重量の変化と同様に、感作あるいは PPD 処置によつて変動し肺の病理的所見の消長に平行している。なお空洞形成は、第1群では4週頃から、第2群では2週頃から観察された。

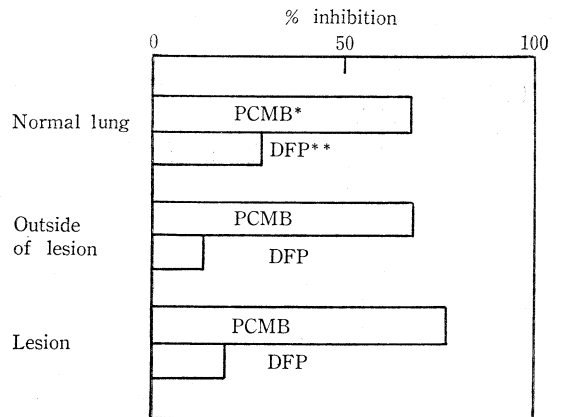
一方肺組織ホモジネートの蛋白 1 mg 当りの比活性を測定してみると、比活性と各群家兎肺の病変の程度、消長との間には一定の関係は認められなかつたが、非病巣部の値 $0.05\sim 0.15\mu\text{moles/mg protein}$ に比べて、病巣部では $0.2\sim 0.8\mu\text{moles/mg protein}$ と常に病巣部が高値を示した (Fig. 5)。また死菌を肺注した家兎から Myrvik⁹⁾の方法により採取した肺胞マクロファージの蛋白分解活性は、 $0.78\sim 1.09\mu\text{moles/mg protein}$ で病巣部の値を上まわる活性を示した。

4) 蛋白分解反応に対する阻害剤の影響

ここで測定された蛋白分解反応は、アミノ酸の蛋白からの遊離という全体的な形でとらえられており、幾種類ものプロテアーゼが関与していることは想像にかたくない。そこで、病巣部分に増加するのはいかなるプロテアーゼが主であるかを検討するために、以下に示す蛋白分解酵素阻害剤による実験を試みた。

①活性基阻害剤

すでに多くのプロテアーゼが発見されているが、その活性基から、SH 型と Seryl-OH 型に分類することができる。そこで病巣部、非病巣部の酵素につき、前者(SH 酵素) 阻害剤として PCMB (p-Chloro Mercuric Benzoate) を、後者 (Seryl-OH 酵素) 阻害剤として DFP



Inhibitor conc. 0.67 mM

PCMB* p-Chloro Mercuric Benzoate

DFP** Di-iso-Propyl Fluorophosphate

Fig. 6. Inhibitory effects of PCMB and DFP to proteolysis of lung tissues.

(Di-isopropyl Fluorophosphate) を使用して阻害を検討したところ、DFP では20~30%の阻害に比し、PCMB では70~80%の阻害が観察された。このことは、病巣部、非病巣部の別なく SH 型 (チオール) プロテアーゼが多く存在することを示唆している (Fig. 6)。

②蛋白分解酵素阻害剤の影響

梅沢、青柳ら¹⁰⁾によつて近年蛋白分解酵素阻害剤の研究が進み、次々と多くの蛋白分解酵素阻害剤が発表され

ている。われわれは青柳博士より、3種の阻害剤の恵与を受け、これらを用いて肺組織の蛋白分解反応に及ぼすこれら阻害剤の影響について検討し、実験結果をTable 1にかかげた。肺組織の蛋白分解反応はElastinal (Elastase Inhibitor), Leupeptin (Cathepsin B Inhibitor), Chymostatin (Chymotrypsin type protease inhibitor), Pepstatin (Pepsin or Cathepsin D Inhibitor) ですべて阻害をうける事実から、上記の酵素の存在が推定される (Table 1)。表にかかげた濃度の阻害剤による阻害は単独肺注動物におけるキモスタチンを除いて、病巣部の方が非病巣部より強い阻害をうけており、このことは、病巣部に上記プロテアーゼが増加していることを示している。また肺組織ホモジネートの凍結融解や超音波破壊によつて、酵素活性の上昇が認められることからカテプシンを中心とするライソゾームプロテアーゼの関与が考えられる。

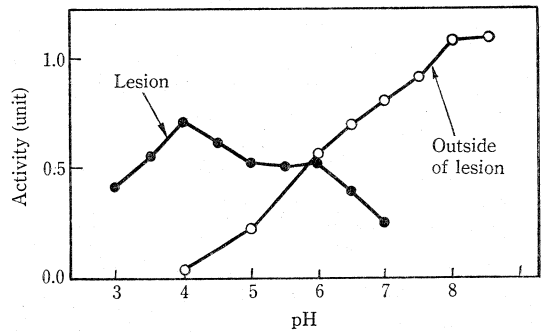
Table 1. The Effects of Protease-inhibitors on the Proteolysis Activity

	Intrapul. inj.		Presensitized & Int. pul. inj.	
	Outside of lesion	Lesion	Outside of lesion	Lesion
	(% inhibition)			
Elastinal (50 μ g/ml)	12	49	44	60
Pepstatin (5 μ g/ml)	20	52	21	41
Leupeptin (5 μ g/ml)	32	52	21	41
Chymostatin (5 μ g/ml)	66	45	54	66

5) 結核病巣のチオールプロテアーゼの上昇と新プロテアーゼの存在

肺組織の蛋白分解反応はPCMBによつて強く阻害されること、およびChymostatin, Leupeptineの阻害の程度からして (Fig. 6) 病巣部にはチオールプロテアーゼの活性増加が考えられるのでチオール型のライソゾームプロテアーゼに焦点をあてカテプシンB系統の酵素について検索した。

H₃₇Rv 加熱死菌肺注後、26日目の動物を殺し各動物より、Myrvik⁹⁾の方法で肺胞マクロファージを採取した後、肺を取り出し、病巣部と非病巣部に分け、おのおのの部分とマクロファージの3組織につき、BANA およびBAEEを基質として、酵素活性を測定した。両者はともにチオールプロテアーゼであるカテプシンB系酵素の基質であるが、結核病巣においてはそれぞれ別個の酵素と



pH 3.0~pH 6.0: Citrate buffer
pH 6.0~pH 8.5: Tris maleate buffer

Fig. 8. pH curve of AA₃ ME esterase in the lung tissue of the rabbits challenged with heat killed H₃₇Rv.

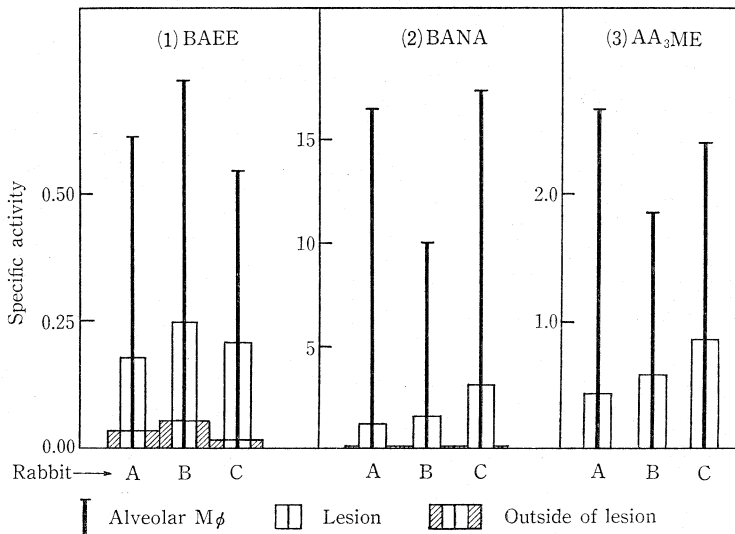


Fig. 7. Thiol protease activities in the lung tissue of the rabbits challenged with heat killed H₃₇Rv.

して分離することができた。この2つの酵素は Fig. 7 にみられるように非病巣部に比べて病巣部における活性が明らかに上昇している (BANA を基質とする非病巣部の酵素活性は 0 に近い)。更に採取された肺胞マクロファージのこれらチオールプロテアーゼは病巣部よりはるかに高い比活性を示した。

一方エラスターゼの基質 AA₃ME を用いて病巣部、非病巣部の粗抽出液を酵素標品として、各 pH における酵素活性を測定したところ、Fig. 8 に示すような結果が得られた。

すなわち非病巣部の酵素は至適 pH が 8.5 とアルカリ側にあり、pH 4.0 ではほとんど活性がみられないのに反して、病巣部の酵素は pH 4.0 が至適であり、アルカリ側では活性の低下がみられた。

この現象は、後に解析を進めた結果、病巣部分には、非病巣部に存在する至適 pH 8.5 の AA₃ME 分解酵素と、pH 4.0 に至適 pH をもつ AA₃ME 分解酵素の2種類が存在し、この2つは Sephadex G-75 ゲル濾過によつて、分子量の異なる2つの酵素に分離することができた。

この病巣部に存在し非病巣部にはほとんど存在しない至適 pH 4.0 の AA₃ME 分解酵素はカテプシン B によく似たチオールプロテアーゼであり、精製と性質に関する報告は別報にゆずるが、チオールプロテアーゼでありながらエラスターゼ(セリンプロテアーゼ)の基質、AA₃ME を酸性側 (pH 4.0) で分解することから今までに報告されていない新プロテアーゼであろうと考えられる。

この酵素の活性は Fig. 7 に示されているが、図にみられるごとく、非病巣部にはほとんどこれを証明しえない。またこの酵素の肺胞マクロファージにおける活性は病巣部の3~6倍もあり、他のチオールプロテアーゼにおいても非病巣部<病巣部<肺胞マクロファージの順に活性が高く、これら病巣部分プロテアーゼ活性の上昇は主として、増加した肺胞マクロファージに由来するのではないかと考えられる。

総括と考察

結核空洞の成因の根底にアレルギー反応が関与していることはまぎれもない事実であるが、結核病巣の軟化融解のメカニズムについては多くの未知の分野が残されている。

周知のように、結核症は結核菌の侵入による滲出炎に始まり、結核性肉芽が形成され、感染の重篤な場合は病巣周囲の小血管の血行障害と相まつて病巣は壊死に陥り、次いで壊死巣の軟化融解、あるいは乾酪化がみられる。この過程で、軟化融解物質が灌注気管支をへて排出されれば空洞が形成される。本研究のように比較的極端な実験条件では空洞形成がみられ、壊死巣の乾酪化—石灰沈

着はほとんどみられない。

病理学的には、かなりはげしい滲出炎を伴つた病巣に壊死がみられ、続いて軟化融解あるいは乾酪化が起こるとされており、壊死巣の軟化融解により空洞が形成されると考えられている。

われわれは壊死巣の軟化融解には必然的に各種の蛋白分解酵素が関与しているとの想定のもとに本研究を実施した。

一方、結核感作動物に結核死菌を接種すると正常動物に接種した場合に比較して、局所病変は急速にしかも強くあらわれることはよく知られており、また山村ら⁹は正常動物に結核死菌を肺内接種する前後にわたつて PPD, TAP 等の静脈内注射を続けると肺病変が、抑制されることを報じているので、結核病巣の蛋白分解酵素の消長に、これらの実験条件がどのように影響するかを併せて検討し、以下の結果を得た。

1. 肺の結核病巣部の蛋白分解能は非病巣部あるいは正常肺組織のそれに比較して明らかに上昇している。

2. 肺病変の程度、およびその消長と、肺重量/体重の変動とはよく平行し、また各実験群の動物の肺組織全体の蛋白分解活性と肺重量の変動との間にもほぼ平行関係が認められる。

3. 肺組織の蛋白分解酵素の比活性(組織蛋白 1 mg 当りの活性)は病巣部のそれが非病巣部より常に高く、肺胞マクロファージのそれは病巣部のものよりはるかに高値である。

4. PCMB, DFP および 4 種の蛋白分解酵素阻害剤を使つて、肺組織の蛋白分解能への影響をしらべ、カテプシン B, D, エラスターゼ、キモトリプシン型プロテアーゼの関与が示唆された。また、これらの酵素活性は病巣部に強い。

5. 肺組織の凍結融解あるいは超音波処理により蛋白分解能の上昇することおよび 4. の結果等より、カテプシン B を中心とするライソゾームチオールプロテアーゼに絞つて検討を続け、

a) BANA および BAEE を基質とするチオールプロテアーゼ活性は肺胞マクロファージに最も強く、病巣部はこれに次ぎ、非病巣部が最も弱い。

b) AA₃ME (エラスターゼの基質) を分解するプロテアーゼの至適 pH は非病巣部では pH 8.5 で pH 4.0 では活性はほとんどみられないが病巣部では至適 pH は 4.0 であり、アルカリ側では活性の低下を来した。そこで病巣部の AA₃ME 分解酵素について更に検討を行なつたのに、至適 pH を 8.5 と 4.0 にもつ2つの酵素が存在することが明らかにされ、それぞれの酵素を分離することに成功した。

c) 病巣部にみられる至適 pH 4.0 の AA₃ME 分解酵素はカテプシン B によく似たチオールプロテアーゼであ

り、しかもAA₃MEを酸性側で分解することより、新プロテアーゼと考えられる。この酵素の活性は肺胞マクロファージに強く、病巣部のその3～6倍に及んでいる。

d) 新チオールプロテアーゼはかなり精製がすすんでいるが、更に精製を進めて単一化して、その諸性質については今後に発表したい。

以上の成績から考察すると、ライソゾームの水解酵素(プロテアーゼを含む)の多くがその至適pHを酸性側にもつていることは周知の通りであり、一方結核病巣ではアレルギーの関与によつて病巣部の小血管の血行障害、更には小血管の破綻が起こり、これに伴う病巣部への酸素供給の不足は組織の代謝を嫌気的の方向に傾け、乳酸をはじめとする酸性物質の産生を増加せしめて病巣部のpHの低下を来し、ライソゾームの水解酵素の活動に恰好の場を提供することになる。

また以上の成績に示されているように肺胞マクロファージに諸種の蛋白分解酵素活性が最も強いという事実は、結核病巣に動員されたマクロファージがその異物食作用と相まつて壊死巣の軟化融解に重要な役割を担っていることは想定に難くない。

また結核病巣が壊死にいたるまでの過程における生化学的な変化およびライソゾームプロテアーゼの関与等の検討、更に結核壊死巣の軟化融解の過程に諸種プロテアーゼが具体的にいかにか働いているか等、今後の研究に待たねばならない多くの課題が残されている。結核空洞形成の機序への生化学的なアプローチという広大なテーマの中で、われわれの研究はようやくその緒についたばかりであり、今後も更に研究を進めてゆきたいと考えてい

る。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、多岐にわたる示唆を賜わりご助言くださいました徳島大学医学部 勝沼信彦教授、蛋白分解酵素阻害剤を快くご恵与くださいました微生物化学研究所(東京)青柳高明博士、および本稿の提出にあたり、鄭重なるご校閲を賜りました刀根山病院 堀三津夫院長に、心からなる謝意を表します。

文 献

- 1) Maeda, H., Yamamura, Y., Ogawa, Y. and Yamamura, Y.: *Am. Rev. Resp. Dis.*, 115:617, 1977.
- 2) Katunuma, N. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 52:37, 1975.
- 3) Espinosa, O.R., Dannenberg Jr.A.M. et al.: *Infect. and Immun.*, 8:1,000, 1973.
- 4) Kondo, E. and Kanai, K.: *Jap. J. Med. Sci. and Biol.*: 26:213, 1973.
- 5) Nishi, K.: *Acta Histochem. et Cytochem.*, 11:252, 1978.
- 6) Yamamura, Y., Ogawa, Y., Yamagata, H. and Yamamura, Y.: *Am. Rev. Resp. Dis.*, 98:720, 1968.
- 7) Roberts, P.S.: *J. Biol. Chem.*, 232:285, 1958.
- 8) Barrett, A.J.: *Anal. Biochem.*, 47:289, 1972.
- 9) Myrvik, Q.N., Leake, E.S. and Faries, B.: *J. Immunol.*, 86:128, 1961.
- 10) 梅沢浜夫・青柳高明・竹内富雄: 代謝, 14: 1071, 1977.