

原 著

実験的肺肉芽腫におけるアンギオテンシン  
 転換酵素の局在と経時的推移  
 — Substrate film 法による新しい試み —

吉松 哲之・津田 富康・鬼塚 徹  
 水城 まさみ・岡嶋 透

大分医科大学第三内科

受付 昭和 58 年 8 月 29 日

LOCALIZATION AND CHRONOLOGIC CHANGES OF  
 ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME IN EXPERIMENTAL  
 PULMONARY GRANULOMAS BY THE SUBSTRATE FILM TECHNIQUE

— Comparison with Serum ACE Activity and Tissue ACE Activity —

Tetsuyuki YOSHIMATSU\*, Tomiyasu TSUDA, Osamu ONIZUKA,  
 Masami MIZUKI and Toru OKAJIMA

(Received for publication August 29, 1983)

Localization of ACE (angiotensin-converting enzyme) and its activity in the experimental pulmonary granuloma of rabbit were studied by ACE substrate film prepared from hippuryl-L-hystidyl-L-leucine and purified calfskin gelatin. The pulmonary granulomas were produced in the rabbits by intravenous injection of 1.0 ml of Freund's complete adjuvant or 40 mg of Japanese strain of Bacillus Calmette-Guerin (BCG). At 5, 14, 21, 28, 35, 42, and 49 days after injection, the resulting pulmonary lesions (granulomas) were obtained from the rabbits exsanguinated by severing the femoral artery. Serum ACE activities were also examined at each period.

The granulomas produced by Freund's complete adjuvant at 21 and 28 days of age showed high ACE activity. The activity was seen as numerous sharply defined vacuoles on the substrate film under the epithelioid cells. Those of 42 days of age showed low activity. On the other hand, the granulomas produced by BCG showed generally low ACE activity and the activity was only seen as poorly defined and poorly stained plaques in the granulomas at 14 day of age. The serum ACE levels and the tissue ACE activities changed in a same way through the experimental course.

These findings show that ACE substrate film technique is available for determination of localization and activity of ACE and that most of increased serum ACE in this experiment may originate from tissue ACE in the granulomas.

**Keywords:** Pulmonary granuloma, Adjuvant granuloma, BCG granuloma, Angiotensin converting enzyme, Substrate film technique

**キーワード:** 肺肉芽腫, アジュバント肉芽腫, BCG 肉芽腫, アンギオテンシン転換酵素, サブストレートフィルム法

\* From the Third Department of Medicine, Medical College of Oita, Hazama, Oita 879-56 Japan.

## 緒 言

肉芽腫とアンジオテンシン転換酵素(Angiotensin converting enzyme 以下 ACE と略す)の関係は、Lieberman<sup>1)</sup>がサルコイドーシスにおいて血清 ACE 活性の上昇を認め、その診断的価値を報告したことによって注目された。

その後、サルコイドーシス以外の肉芽腫性疾患でも ACE 活性上昇を示す<sup>2)</sup>一方、典型的肉芽腫を形成する結核症では上昇をみないことが知られ、肉芽腫と ACE との関係が単純なものでないことを示している。また、ACE の由来、あるいは肉芽腫の成熟過程と ACE 活性の推移の関係なども興味深い問題が多い。

今回我々は、実験的に作製したアジュバント肉芽腫と BCG 肉芽腫の組織レベルでの ACE 活性の局在につき、我々が考案した Substrate film 法を用いて検索を行なった。更に、血清中の ACE 活性と、組織内活性の経時変化についても比較検討を加えたので、その成績を報告する。

## 方 法

1) 実験的肉芽腫の作製：家兎に Freund's complete adjuvant の 1 ml もしくは BCG40mg の生食水浮遊液を耳静脈より注射し、肺に肉芽腫を作った。両者とも、5日および2週以後7週まで、毎週3匹ずつ屠殺の上、肺の採取、直ちにアセトドライアイスを含むビーカーの外壁で凍結し保存した。

2) 血清 ACE 活性の測定：アジュバント注射群5匹、BCG 注射群4匹について、5日および2週以後7週まで毎週採血し、ACE 活性を測定した。測定は Lieberman の変法<sup>3)</sup>によった。

3) ACE Substrate film の作製：まず、25mg の Hippury 1-L-Histidy 1-L-Leucine (Sigma chemical Co. Ltd.) (以下 H. H. L. と略す) を 5 ml の蒸留水に溶解したものを A 液とし、これを 40°C に保温した。次に 500mg の calfskin gelatin (Eastman Co. Ltd. を蒸留水 5 ml に入れ、加温溶解、40°C に保温し B 液とした。この A 液、B 液を 40°C の条件下で 1 対 1 に混合した。

あらかじめスライドグラスをパラフィン伸展器上で 40°C に保温し、前述の混合液を 0.1ml ピペットで 0.05~0.1ml スライドグラスに滴下し、ガラス棒で均等に塗布した。水平な平板上で一晩室温で乾燥させた後、このスライドグラスを 10% 中性ホルマリンで 4°C にて一昼夜固定した。その後蒸留水で 3 回洗浄し、4°C 生理食塩水に 3 分間浸し、更に一晩室温で乾燥させた。完成した Substrate film は密閉した箱の中に入れ、使用時まで 4°C の環境下で保存した。

4) 標本作製：凍結した肺より肉芽腫を含む小片を切り出し、cryostat で厚さ 8  $\mu$  の切片を作り、ACE film

上のにせ、急速冷風乾燥固定を行なった。次に切片を 30% の sucrose を含む potassium phosphate-sodium chloride buffer につけ、37°C の環境下で 2 時間反応させた。

その後、20% 中性ホルマリンで 1 時間固定蒸留水で水洗後、0.2% トルイジブルーで後染色、水洗、脱水、透徹、包埋を行ない鏡検した。

5) ACE inhibitor 実験：アジュバント肉芽腫の血清学的変化が最強となる 3~4 週目の切片を、ACE の specific inhibitor であるカプトプリル<sup>4)</sup>  $1 \times 10^{-1}$  モル濃度を加えた 30% sucrose 含有の potassium phosphate-sodium chloride buffer につけ、以下 4) に述べた方法によって、ACE 活性に及ぼすカプトプリルの効果を検討した。

## 成 績

1) 血清 ACE 活性：アジュバント群と BCG 群の ACE 活性の経時的推移を Fig. 1 に示した。正常域は  $60.0 \pm 10.2$  mU/ml で、図中に帯状域として示している。アジュバント群では 3 週後に  $85.1 \pm 19.7$ 、4 週後に  $98.8 \pm 7.8$  と著明な活性の上昇を示し、5 週以後は漸次低値を示した。BCG 群では 2 週後に  $86.7 \pm 6.0$  と軽度の活性の上昇をみたが、全般にアジュバント群に比し、低値の傾向であった。

2) アジュバント肉芽腫の組織学的検討：血清 ACE 値の測定結果をもとに、初期(5日目)、最盛期(4日目)、治癒期(6日目)に分け、各時期における肉芽腫につき検討した。最盛期の組織では、ACE film の強い digestion を示す多数の空胞と染色性の低下が認められた (Fig. 2)。初期および治癒期 (Fig. 3) の標本では、結節中の空胞は僅かしか認められなかった。

3) BCG 肉芽腫の組織学的検討：BCG 肉芽腫では、血清 ACE 値をもとに初期(5日目)最盛期(2日目)、治癒期(6日目)に分け、各々につき検討を行なった。最盛期 (Fig. 4) では、ACE film の染色性の低下は認められるが、殆んど消化空胞は認められず、アジュバント肉芽腫の最盛期と比べ、はるかに低い活性しか認められなかった。また、初期と治癒期 (Fig. 5) の標本では、結節内に空胞や染色性低下は、殆んど見出だせなかった。

4) ACE inhibitor の効果：前述のアジュバント肉芽腫最盛期の切片を用いて ACE inhibitor の効果を検討した結果、ACE film 上には、空胞形成、染色性低下とも見出だせなかった。

## 考 案

肉芽腫の発育過程におけるマクロファージや類上皮細胞と ACE の関連は次第に明らかになりつつある。肉芽腫の ACE 活性の局在については、サルコイドーシスのリンパ節を免疫学的手法で検索した報告がある。<sup>7)8)</sup>

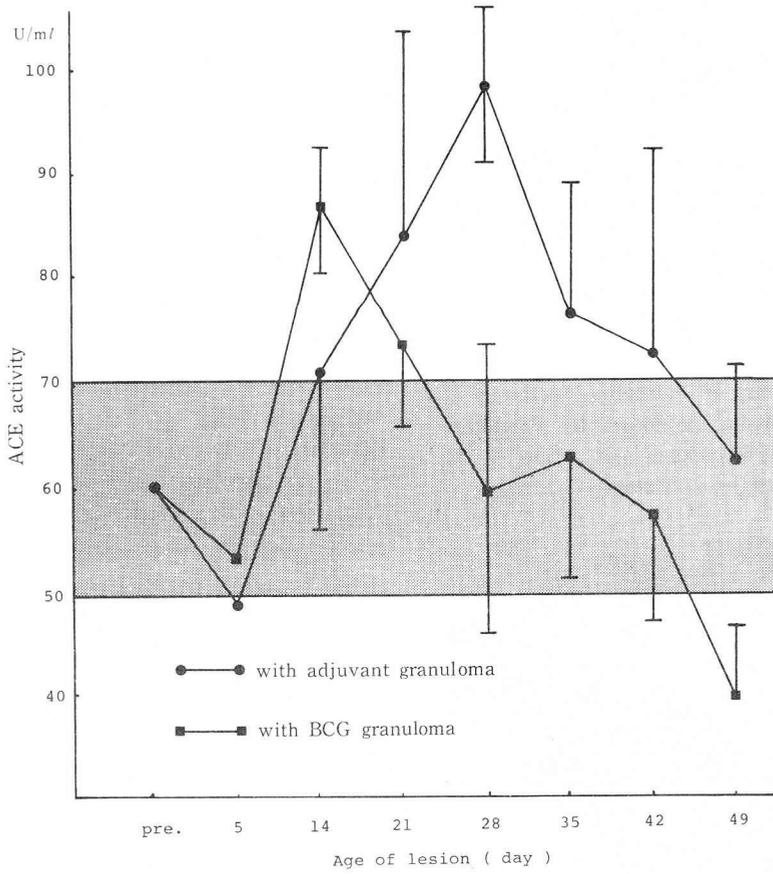


Fig. 1. Serum angiotensin-converting enzyme activity in rabbits with granulomas induced by BCG or Freund's complete adjuvant.

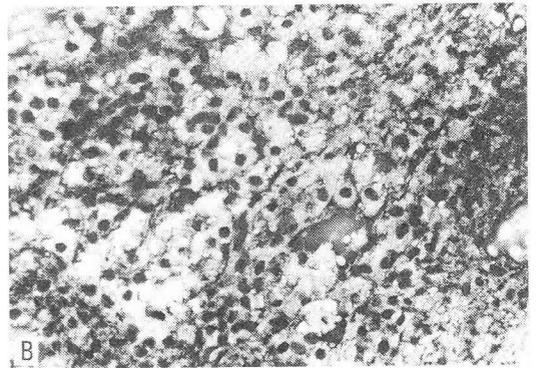
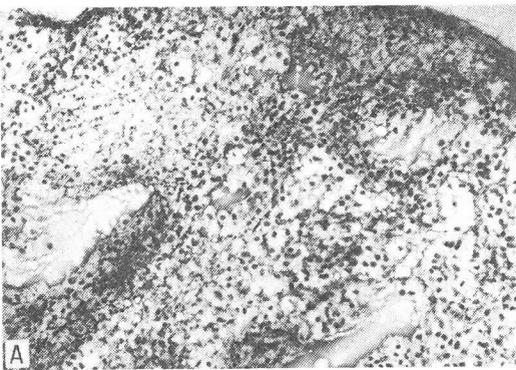


Fig. 2. ACE activity of epithelioid cells in a pulmonary granuloma produced by Freund's complete adjuvant 3 weeks of age. Numerous digestive vacuoles are seen in the granuloma.

A. low magnification ( $\times 150$ )

B. high magnification ( $\times 300$ )

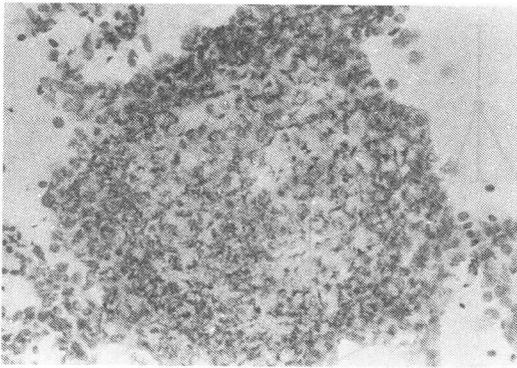


Fig. 3. ACE activity of epithelioid cells in a pulmonary granuloma produced by Freund's complete adjuvant 6 weeks of age. Low ACE activity is seen in the granuloma. ( $\times 150$ )

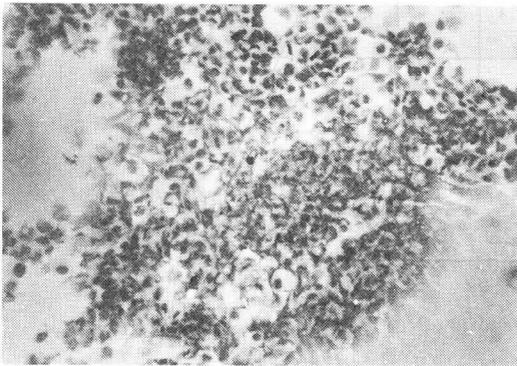


Fig. 4. ACE activity of epithelioid cells in a pulmonary BCG lesion 2 weeks of age. There are many epithelioid cells which show low ACE activity. Such activity appears white and represents digestion of the dark blue ACE substrate film beneath. ( $\times 150$ )

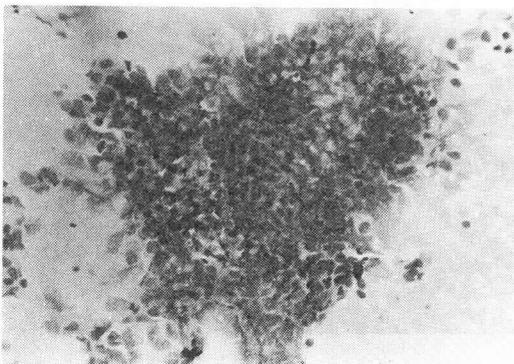


Fig. 5. ACE activity of epithelioid cells in a pulmonary BCG lesion 6 weeks of age. No ACE activity is seen in the granuloma. ( $\times 150$ )

しかし、その細胞に ACE が活性化されてくる機序については、殆んど不明であるばかりではなく、その病態生理学的な働きについてもまったく明らかになっていない。そこで我々は、サルコイドーシスと結核のモデル実験として、Freund's complete adjuvant<sup>9)</sup>と BCG 生食水浮遊液とを使用し、実験的肉芽腫を作り、その血清 ACE 活性を経時的に測定するとともに我々が考案した substrate film 法を用い、肉芽腫の発育過程における組織 ACE 活性の推移を把握しようと企てたのである。その結果アジュバント群では注射後 3~4 週目(最盛期)において血清 ACE 活性の著明な上昇がみられた。この時期の ACE film 標本では、多数の空胞と染色性の低下がみられたが、これらは同部における substrate film の digestion を示すものであり、換言すれば、類上皮細胞結節に ACE 活性の局在が示唆されたのである。そこで、この時期の ACE film 標本を ACE の specific inhibitor であるカプトプリルで処理したところ、 $1 \times 10^{-1} M$  の濃度で完全にその活性を抑制し、前記の空胞や染色性の低下は出現しなくなった。即ち、これらの変化が ACE 活性によるものであることが証明されたのである。一方、アジュバント群の初期および治癒期の肉芽腫には殆んど ACE 活性を認めることができなかつた。即ち、血清 ACE 活性は組織内の ACE 活性の強さと並行して推移したのである。この結果より、血清 ACE の由来を肉芽腫の類上皮細胞に求められるのではないかと推測されるのである。実験動物において肺病変作製時の血清 ACE 活性の推移についての報告<sup>9)</sup>はあるが、組織学的に ACE 活性の局在とその推移を検索したのは本報告が初めてである。我々の用いた方法は、反応の強さ、および酵素活性の程度を知ることができ、個々の細胞レベルでの ACE 活性を半定量的に評価することが可能である。本法についての他のタンパク分解酵素<sup>9)</sup>の影響は、pH が 8.3 と高いこと、および既に述べたように ACE inhibitor の使用により活性が抑えられたことにより、除外できると考えられる。BCG 肉芽腫における組織 ACE 活性は、アジュバント肉芽腫における活性よりはるかに低く、血清 ACE 活性の差とほぼ一致するものであった。この相違が各々の肉芽腫を形成する細胞(マクロファージの subtype や他の網内系細胞など)の相違によるものか、あるいは ACE が単に肉芽を誘発する不特定の刺激物質により、活性化された酵素にすぎないものかなどは、いまだに不明である。少なくとも我々の結果からは、ある種の肉芽腫では、その成熟過程で ACE が類上皮細胞に特異的に活性化されてくること、特にアジュバント肉芽腫では、この傾向が強く示されることが証明された。今後は ACE が類上皮細胞に活性化されてくる機序を解明することによって、類似した類上皮細胞の起源を明らかにできるのではないかと考えている。

## 結 論

家兎のアジュバント肉芽腫およびBCG肉芽腫を作り、血清ACE活性を、経時的に測定するとともに、我々の考案した substrate film 法を用い、組織レベルでのACE活性の局在を経時的に検索した。

アジュバント肉芽腫では、血清ACE活性値は、3～4週目に最も高く、組織内ACE活性もこの時期に著明に認められた。しかし、初期・治癒期では殆んど認められず、血清中および肉芽腫のACE活性の推移はほぼ一致していた。この結果より血清ACEの由来は肉芽腫の類上皮細胞に求められるのではないかと考えた。一方、BCG肉芽腫では、ACE活性は全経過を通し殆んどなく、あっても軽微であった。

本論文の要旨の一部は、第58回日本結核病学会総会において報告した。

## 文 献

- 1) Lieberman, J. : Elevation of serum angiotensin-converting-enzyme (ACE) level in sarcoidosis, *Am J Med*, 59 : 365, 1975.
- 2) Lieberman, J. et al. : Serum angiotensin-converting enzyme for diagnosis and therapeutic evaluation of sarcoidosis, *Am Rev Resp Dis*, 120 : 329, 1979.
- 3) 山本節子他 : 血清アンギオテンシン変換酵素活性測定法の検討, *日胸疾会誌*, 18 : 297, 1980.
- 4) Cushman, D. W. et al. : Design of new anti-hypertensive drugs : Potent and specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme, *Progr Cardiovasc Dis*, 21 : 176, 1978.
- 5) Lieberman, J. et al. : Serum angiotensin-converting enzyme and lysozyme in rabbits with pulmonary granulomatosis induced by complete-Freund's adjuvant and B. C. G. Presented at the eighth International Conference on Sarcoidosis and Other Granulomatous Disease, Cardiff, Wales, September 12, 1978.
- 6) Tsuda, T. et al. : Enzymes in tuberculous lesions hydrolysing protein, hyaluronic acid and chondroitin sulfate : A study of isolated macrophages and developing and healing rabbit BCG lesions with substrate film techniques ; the sift of enzyme pH optima towards neutrality in "Intact" cells and tissues, *J Reticuloendothel, Soc*, 16 : 220, 1974.
- 7) Ryan, J. W. et al. : Localization of angiotensin converting enzyme (kininase II). I Preparation of antibody-heme octapeptide conjugates, *Tissue & Cell*, 8 : 111, 1976.
- 8) 高田泰治他 : サルコイドーシスリンパ節アンギオテンシン変換酵素の酵素化学的、および免疫学的性質とその細胞内局在, *日胸疾会誌*, 21 : 141, 1983.
- 9) 上田英之助他 : 実験的肺病変時における肺アンギオテンシンI変換酵素活性の変動, *日胸疾会誌*, 17 : 83, 1979.