

実験的結核病巣における脱水素酵素の組織化学的研究

京都大学結核研究所病理学部（主任教授 高松英雄）

水 谷 昭，引 間 啓 祐，岡 田 彰

最近10年余りにおける酵素の組織化学的研究の著しい発達の中で，酸化・還元酵素に関する組織化学的手技の開発は特に目覚ましいものがある。即ち，脱水素酵素に関しては Seligman Rutenburg によるコハク酸脱水素酵素¹⁾²⁾，Farber 等³⁾⁴⁾，Nachlas 等⁵⁾，Pearse 等⁶⁾⁷⁾による Diaphorase 及 coenzyme dependent の脱水素酵素の組織化学的方法の研究は，その後 Nitro BT, MTT 等のすぐれた tetrazolium 塩が広く市販され，又，cryostat の普及による新鮮切片の作製が容易になった事等の事情から，最近急速な進歩を遂げた新しい分野であり，正常組織は勿論，腫瘍等の病的組織における脱水素酵素の研究報告は急速にその数を増している。而して，結核症の研究に於ても，従来組織化学的手技の開発に伴い，それらはいちはやく応用され，数々のすぐれた報告があり，枚挙にいとまのないところであるが，酸化・還元酵素についての研究は比較的少く，特に上述の各種脱水素酵素に関する適確な報告は未だ認めないのが現状である。われわれは結核症の組織像で最も特徴とされる類上皮細胞に特に重点をおき実験的結核病巣での各種脱水素酵素反応を系統的に検討した。

実験方法

1 材料：体重約 2 kg の成熟家兎 8 匹の背部皮下組織で，相互の間隔 5 cm 以上の部位 6 ケ所に牛型 Rm 株 0.1mg（生理食塩水浮遊）を注射，3 週及 9 週後に 4 匹宛屠殺した。菌接種部位は何れも結合組織膜を被った小結節を形成し，中心部は軟化融解している。これらを速やかに摘出し，ドライアイスで氷結せ

しめ，cryostat 切片とした。又，一部は10%フォルマリンで固定，パラフィン切片とした。更に同様に菌を接種した家兎 5 匹について菌接種 1 週以後，随時摘出して伸展標本による干渉位相差顕微鏡での細胞学的研究に併行して各種染色を行った。その他，家兎(10匹)及廿日鼠(dd系20匹)に牛型 Rm 株又は人型 H₃₇Rv 株 0.1mg を静注したもの，及び海狸(10匹)大腿部皮下に人型 H₃₇Rv 株 0.1mg を接種したものについて 3 及び 9 週後に屠殺し，その肺，肝，脾の新鮮凍結切片を作製した。

2 染色：対象とした酵素はコハク酸脱水素酵素，Diaphorases 及 coenzyme dependent の脱水素酵素群で，染色法は原則的に Rutenburg 等²⁾及び Pearse 等の方法⁶⁾により，これに若干の修整を加えたものである。水素受容体としては Nitro-BT (Dajac Laboratory 製)を使用した，Blue tetrazolium を使用する Wachstein 等のコハク酸脱水素酵素反応に比し，反応時間は著しく短縮され，15分以内で充分である。又，Diaphorase 関係の酵素反応には，基質 (substrate) として DPNH, TPNH, 乳酸ソーダ，リンゴ酸，イソクエン酸， β -hydroxy 酪酸，グルタミン酸ソーダ及び glucose-6-phosphatase (G-6-P) を使用した。

その他，フォルマリン固定標本で形通りのヘマトキシリン・エオジン染色 (H・E 染色) を行い，一部 PAS 及 Sudan IV 染色を併せ行った。

一般に類上皮細胞の形態学的鑑別は酵素反応の標本，或いは場合によって H・E 染色でも必ずしも容易でない事があり，この意味で類上皮細胞層の明確な皮下組織の結節は観察に最も便利であって，特にこれに重点をおいた。

実験成績

まず得られた成績で類上皮細胞での所見を一覧表に示すと表 1 の様になる。

1. 家兎における反応

② 皮下組織の所見

本研究の類上皮細胞に関する要旨は第37回日本結核病学会総会シンポジウムの一部として発表した。

本研究は文部省科学研究費の補助による。

第 1 表

	家 兎				モ ル モ ツ ト			マ ウ ス		
	皮下	肺	肝	脾	肺	肝	脾	肺	肝	脾
コハク酸ソーダ	++	++~+	++~+	++	+~±	+	+	±	+	+
DPNH	++	++~+	+	+	+	+	+	+	+	+
TPNH	++	++~+	++	++	++	++	++	+	++	++
乳酸ソーダ	++	+	+	+	+	+	+	+~±	+	+
リンゴ酸	++	+	+	+	+	+	+	+~±	+	+
イソクエン酸(DPN)	+	+~±	+	±	±	+~±	±	±	±	±
〃 (TPN)	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+
β -hydroxy 酪酸	+	+~±	+	±	+	+~±	±	±	±	±
グルタミン酸	+	±	+	±	±	+~±	±	±	±	±
G-6-P	++	++~+	+	+	+	+	+	+	+	+

(註) 牛型 Rm, 及び人型 H₃₇Rv による結核病巣の類上皮細胞における反応について 3~9 週の所見を平均したものである。

家兎皮下組織に於ては 3 週で明確な結合織被膜を被った結節を形成し、中央部は軟化融解している。組織学的には中央壊死部の外層に類上皮細胞層、更に外層に結合織層が形成されている。しかし、この両層の区別は必ずしも明確でなく、錯綜しているものがあり、結合織層に喰細胞その他の炎症細胞の浸潤が顕著である。又、毛細血管の新生を認めるものもある。9 週後には結節の層構造が極めて明確となり、中央の壊死部を包んで、定型的な類上皮細胞層、結合織細胞層が区別されるので、類上皮細胞に関する組織化学的な観察には最も適当である。又、この層には屢々ラ氏型巨細胞を認める。

扱、皮下結節の類上皮細胞に於ける脱水素酵素反応は一般に強い陽性を示し、表 1 に示す如く、Diaphorases, 乳酸, リンゴ酸, glucose-6-phosphate, コハク酸等の反応が特に強く、青色の微細な formazan 顆粒が胞体内に充満している。これに反し、 β -hydroxy 酪酸, グルタミン酸, イソクエン酸 (DPN-dependent) 等の反応は稍弱い様である。尤も、これらの反応は正常でも稍弱く、若干長時間の incubation を必要とするが、それを考慮しても尚反応が弱い様である。中央部壊死層は完全に陰性で、これに接する類上皮細胞でも屢々陰性の事があるが、これらは何れも変性壊死に陥ったものと考えられる。又、類上皮細胞層に認められるラ氏型巨細胞では、その胞体内に顕著な formazan 顆粒

の沈着がある。一般的な傾向として、胞体の外側に配列する核周囲の原形質に反応が最も強い様である。又、外側結合織細胞や再生毛細血管の内皮細胞もかなり強い陽性を示す。而して 3 週の cryostat 切片、又はそれ以前の伸展標本に於て多数認めるところの大型喰細胞もかなり酵素活性を示し、この活性は、反応初期に好中球等の浸潤に引続き、漸くその数が増加して来るところの菌接種 2~4 日後から既に認められるものである。

⑤ 肺における所見

肺においては結核菌静注後、2~3 週に既に大小多数の結節が形成され、その多くは類上皮細胞結節の形をとり、乾酪変性は認めない。周囲にはかなり“肺胞喰細胞”その他の細胞浸潤を認める。

脱水素酵素反応では最も特徴的な所見として、肺胞内及肺胞壁部に多数みられる上記の所謂肺胞喰細胞は何れの脱水素酵素反応も強陽性であるが、結節内部の類上皮細胞では Diaphorases 及 TPN-dependent の脱水素酵素以外の諸反応がかなり減弱している場合が多い。この傾向は 2 週頃の小结節に於ても明らかに認められる。然し乍ら、反応が全く陰性と云うわけではなく、種々の程度に陽性のものを認める。

尚、気管支上皮細胞は殆ど常に強陽性である。

⑥ 肝における所見

肝においても多数の粟粒大の類上皮細胞結節を認めるが乾酪巣は見出し得なかった。

一般に肝細胞が各種脱水素酵素反応強陽性で、コハク酸脱水素酵素は周辺性に、その他の脱水素酵素群は中心性に強い傾向を示す。結節における類上皮細胞では肝細胞に比し、稍反応が弱く、唯 TPN diaphorase の反応はかなり強い。特に9週経過した大きな病巣では、乾酪巣は特に認めないが、反応の非常に弱い場合が屢々で、むしろ再生胆管組織や、増殖した結合組織細胞に強く反応を認める事が多い。尚、コハク酸脱水素酵素反応で、Coenzyme Q₁₀, Menadione (Vitamin K₃) がその反応を促進するとの報告がある⁹⁾が、本実験で Vitamin K₃ を添加しても、類上皮細胞の活性が特に増強された様な所見は認めなかった。しかも肝細胞は明らかに促進され、反応時間は更に短縮された。

④ 脾における所見

脾に於ては一般に洞内皮細胞が各種脱水素酵素反応強陽性を示すが、結節内類上皮細胞も種々の程度に陽性である。特に TPN-diaphorase G-6-P 脱水素酵素等の反応が強く、DPN-diaphorase, コハク酸脱水素酵素等もかなり強い反応を示している。

2. 海猿及廿日鼠における所見

肺, 肝, 脾に夫々定型的な結核病巣を形成しており、その諸反応をしらべたのであるが、家兎の成績に略併行している。

類上皮細胞では種々の程度に反応陽性で、TPN- 及 DPN-diaphorases の反応が特に強い様である。而して、所謂肺胞喰細胞, 肝の星芒細胞等の喰細胞は菌接種後初期から強い活性を示し、結節周囲で最も強い formazan の着色を呈しており、これが結節の類上皮細胞に移行すると、反応はむしろ減弱する様である。その他時々認めるラ氏型巨細胞は概ね反応強陽性である。又、結節内或いは結節周囲に増殖した結合組織細胞は何れも強陽性を示している。

廿日鼠の肺において屢々認めたところの細葉性結節性の病巣で、胞隔の喰細胞は各脱水素酵素反応強陽性であるのに反し、内部の腔内に充実にみられる類上皮細胞はすべて完全に陰性

の場合があり、H・E 染色で所見の現われる以前に既に広範囲に変性・壊死に陥ったものと思われる。

又、脾においては洞内皮に強陽性であるが、類上皮細胞では TPN-diaphorase, G-6-P 脱水素酵素等を除いて一般に反応が弱い事は家兎の場合と同様である。

考 按

1. 脱水素酵素の組織化学的方法について

脱水素酵素は生化学的に次の三型に大別されている⁹⁾。

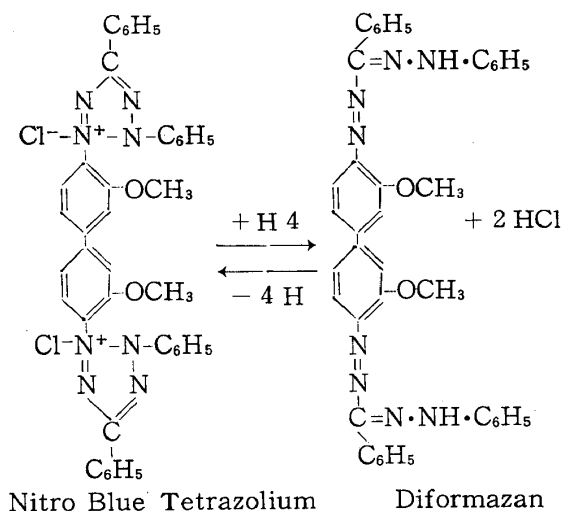
- i) Coenzyme を必要としないもの……コハク酸脱水素酵素等。
- ii) DPN を必要とするもの。
乳酸脱水素酵素等
- iii) TPN を必要とするもの。
G-6-P 脱水素酵素等

尚一部には DPN, TPN 何れでも作用し得るものもある(イソクエン酸脱水素酵素等)

而して、組織化学的には Seligman & Rutenburg('51)^{11,12)} によるコハク酸脱水素酵素の反応 Farber 等による diaphorases の証明法の考案('54-'56)^{3,4)} によって急速な発達をとげ、Nitro-BT, MTT 等のすぐれた tetrazolium 塩の合成と、cryostat の普及により新鮮切片の作製が容易になった事等の事情から更に詳細な検討が可能となったのである(Pearse et al '58⁹⁾, Scarpelli et al '58⁹⁾)

然し乍ら、ここに留意すべき事として、諸種脱水素酵素の組織化学的方法で、所謂 nothing dehydrogenase¹⁰⁾、或いは endogenous activity の問題はさておくとして、上述の coenzyme dependent の脱水素酵素の染色では、図1の tetrazolium の還元が図2に示される様に¹¹⁾、諸種脱水素酵素の直接作用によって惹起されるものではなく、それぞれに結合した diaphorase の二次的な作用によって還元されるものである。即ち、組織化学的にわれわれが認めるところの formazan 顆粒は各脱水素酵素作用に引続きおこる DPN- 又は TPN-diaphorases 作用の反応部位を示しているのであるが、その大部分

図 1



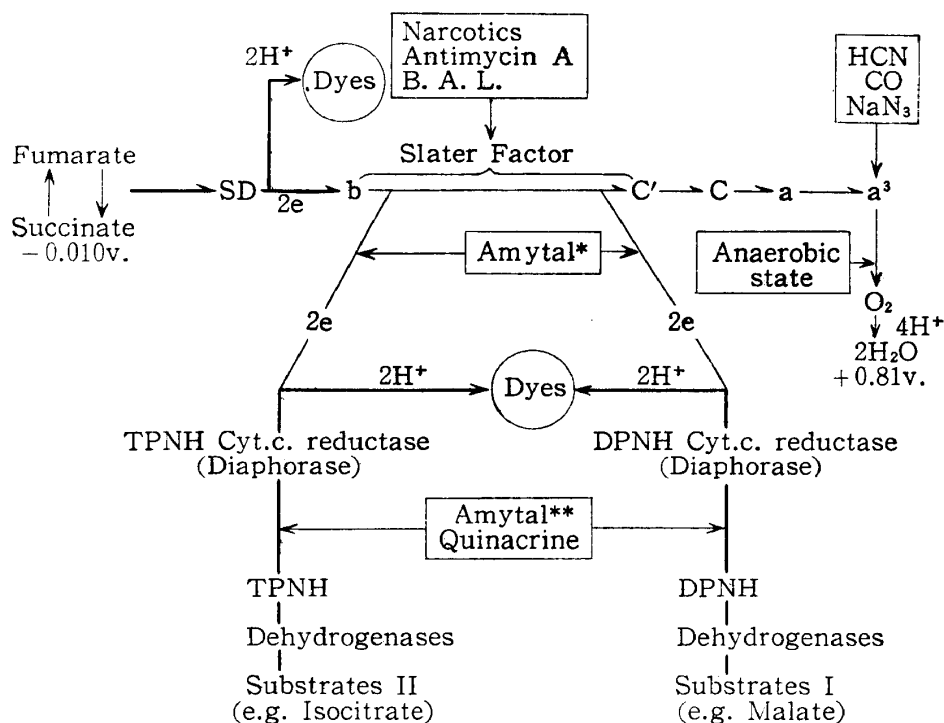
が、前段階の脱水素酵素による DPN 又は TPN の還元なくしてはおこり得ない事や、臓器部位によって、同一 DPN- 又は TPN-dependent 酵素群でも若干それらの分布の異なる事等から、脱水素酵素作用を間接的に表現しているものと考えられる。然し乍ら、例えば乳酸脱水素酵素の様ないわゆる“溶性”(soluble) 酵素の場合、凍結、融解、incubation 等の操作の間に disso-

ciate する可能性は強く、formazan 沈着部位のすべてがその脱水素酵素の局在を示すものか疑問の余地なしとしない。何れにせよ、tetrazolium 還元反応がこの種脱水素酵素作用の単独の表現ではなく、反応系としての総合的な表現である事を充分念頭においておくべきである。唯、現在までのところ、DPNH, TPNH を substrate としての diaphorase 反応はこれら coenzyme dependent 脱水素酵素群のそれに比して、常に反応が強く、分布も同一か又は更に広い様な成績が得られており、又、種々の条件に対する抵抗性等からも diaphorase による tetrazolium 還元作用が弱い為に脱水素酵素作用の表現が過少評価される事は殆どないと考えてよからう。最近、乳酸脱水素酵素の heterogeneity が注目され、Dewey 等^{12) 13)} は電気泳動の所見から腎組織のそれは直接 tetrazolium を還元するものが含まれている事を報告しているが、それらは抄録を以て知のみでどの程度組織化学的に非特異的な反応を除外して証明されるか明らかでない。事実、腎

の新鮮切片等で Nitro-BT を使用する場合、基質を使用しないで反応さしたり、或いは DPN も同時に除外した場合にも尚若干 formazan の生成があり、それらが真の乳酸脱水素酵素作用に関係あるものか、疑問の点が少くない。この問題は尚今後の課題としたい。

次にコハク酸脱水素酵素に関しては、古くから coenzyme を必要としない酵素として知られ、脱水素酵素作用で直接 tetrazolium 塩が還元されると考えられて来たが、phenazine

図 2



* Probable site in frozen-thawed mitochondria.

** Probable site in normal mitochondria.

Pearse: Histochemistry より

methosulfate が *intermediator* として反応を促進することが知られ (Farber 等¹⁴⁾), 更に近年, Wattenberg & Leong は Coenzyme Q₁₀ 或いは menadione (Vitamin K₃) が *intermediator* として新鮮切片での反応を著しく促進する事を報告した⁹⁾。著者もこれらの添加によって, パラフィン切片でも或程度染色可能である事を明らかにした¹⁵⁾¹⁶⁾。本実験に於ても肝組織等でこれらの *intermediator* の作用を調べたが, 肝細胞ではたしかに反応が強く促進されるが, 反応の減弱した類上皮細胞では, これらの添加で特に反応が増強されたと云う所見は得られなかった。この事は類上皮細胞での活性低下は *intermediator* の不足ではなく, 酵素自身に変化の来た事を暗示するものであろう。又, Wegmann & Caridroit ('60)¹⁷⁾ は適当な *inhibitor* の使用によって succinic oxidase と succinic dehydrogenase とを組織化学的に区別し得る事を述べているが, 實際上, 後者の作用が遙かに強く, 我々は特にこれを区別しなかった。

2. 結核病巣における脱水素酵素反応

結核病巣について, 各種酵素の組織化学的研究は多数認められるが, 脱水素酵素に関しては報告が少く, 古く Hsu ('53)¹⁸⁾ が NT, TTC を用いて結核性及 Sarcoidosis の類上皮細胞に陽性であると報告し, 大根田 ('55)¹⁹⁾ はコハク酸を基質とし, TTC を用いてコハク酸脱水素酵素の証明を行い, 類上皮細胞層に活性が強いことを認め, これが脂肪変性に陥ると活性が消失して, 更にストレプトマイシンや INAH など投与することにより, 類上皮細胞のコハク酸脱水素酵素の活性が上昇することを報じている。

然し乍ら, これら古典的な方法による研究では現象をその儘把握する程度で, それ以上の解析, 理解は不可能であった。その後, 家森教授等²⁰⁾²¹⁾²²⁾ は皮下結節の伸展標本について, 位相差顕微鏡による細胞学的研究と併行して, 類上皮細胞で cytochrome oxidase 強陽性であると共に, NT-methylene 青法によって強い tetrazolium 還元反応を示す事を明らかにし, これに flavin 酵素の関与を推察すると共に, 喰細胞の類上皮細胞化の過程におけるこれら酵素反

応の上昇に意義を強調し, 代謝機転昂進を指摘したのである。然し乍ら, それ以上の諸種脱水素酵素についての分析が行われていないが, 当時の組織化学的方法の実情から, より以上の追求は不可能であったと思われる。唯, 既に著者も指摘した如く²³⁾, 細胞内の酸化・還元機能の総合的表現としての tetrazolium 還元反応に充分意義のある所見と考えてよいのであろう。

扱, 著者等の得た実験成績をみるに, 類上皮細胞では TPN-diaphorase の反応が最も強く, DPN-diaphorase 及 G-6-P 脱水素酵素等の反応がこれにつぐ。皮下組織の結節ではその他の各脱水素酵素反応も強く, これが, 早期の非特異的な喰細胞から類上皮細胞化してから, 類上皮細胞層としての構造の明確な9週以後に到るまで高い活性を保持し, 壊死層近辺の細胞になって始めて急速に活性を失う。然し乍ら, 肺, 肝, 脾等の臓器における結節では稍所見を異にする。即ち, 肺の“肺胞喰細胞”や, 肝の星芒細胞等は菌の接種によって強い反応を示して結節周囲に認められるが, 比較的早期からみとめる小類上皮細胞結節でも, 類上皮細胞の多くは各脱水素酵素反応が減弱乃至は消失している。即ち, TPN-diaphorase の反応は比較的よく保たれているが, リンゴ酸脱水素酵素その他の DPN-dependent 脱水素酵素群の反応は弱い。この事は TCA-cycle の代謝の減少を示すものであり, 一方, G-6-P 脱水素酵素反応等が比較的よく残っていることは主要な呼吸廻路が TCA-cycle よりもむしろ Pentose cycle にある事を暗示するものであろう。又, これら TPN 系統の反応が比較的残っている事は, Porter²⁴⁾ 等及 Lachance 等²⁵⁾ の云う如く, DPN-dependent 系が脂肪酸の分解に関与し, TPN-dependent 系が脂肪酸の合成に与っているとすれば変性過程の形態学的表現であるところの脂肪変性の機転を示すものとして興味深い。類似の所見として脳壊死(実験的)の際に出現する大型喰細胞が DPN-dependent 脱水素酵素反応陰性で, TPN-dependent 系が強陽性であるとの報告を認める (Rubinstein & Smith²⁶⁾)。尚この問題については代謝の各 cycle について詳細な検討を必

要とする。

次に、皮下組織と他臓器における反応の差異については、その理由として菌量、形成された結節の新旧、大きさ、集合した喰細胞及類上皮細胞の新旧、量、臓器別の喰細胞における酵素自身の化学的性状等種々の要素が考えられるが、現在の段階では未だ確証は得られず、今後尚追求したいところである。何れにせよ、類上皮細胞と云う特異な形態をとる過程において、質的に特異的な代謝と云うよりも量的に代謝機転の著しく昂進した状態で類上皮細胞化し、しかも形態学的に変性、壊死として確認される以前に比較的速やかに各脱水素酵素反応が減弱する場合が多く、且、TPN-diaphorase等のTPNに関係ある酵素反応が稍強く保存される様である。唯、皮下結節におけるそれは比較的成熟した結節内においても類上皮細胞に各脱水素酵素反応が強くみられる。

その他、ラ氏型巨細胞、結合織細胞等もそれぞれ強い反応を示す場合が多いのである。

結 論

家兎の皮下、肺、肝、脾、及海猿並びに廿日鼠の肺、肝、脾における人型菌 H₃₇Rv 株及牛型 Rm 株によって形成された結核病巣での各種脱水素酵素を組織化学的に検討した。対象とした酵素はコハク酸脱水素酵素、DPN-diaphorases、及 coenzyme dependent 脱水素酵素群 6 種類である。

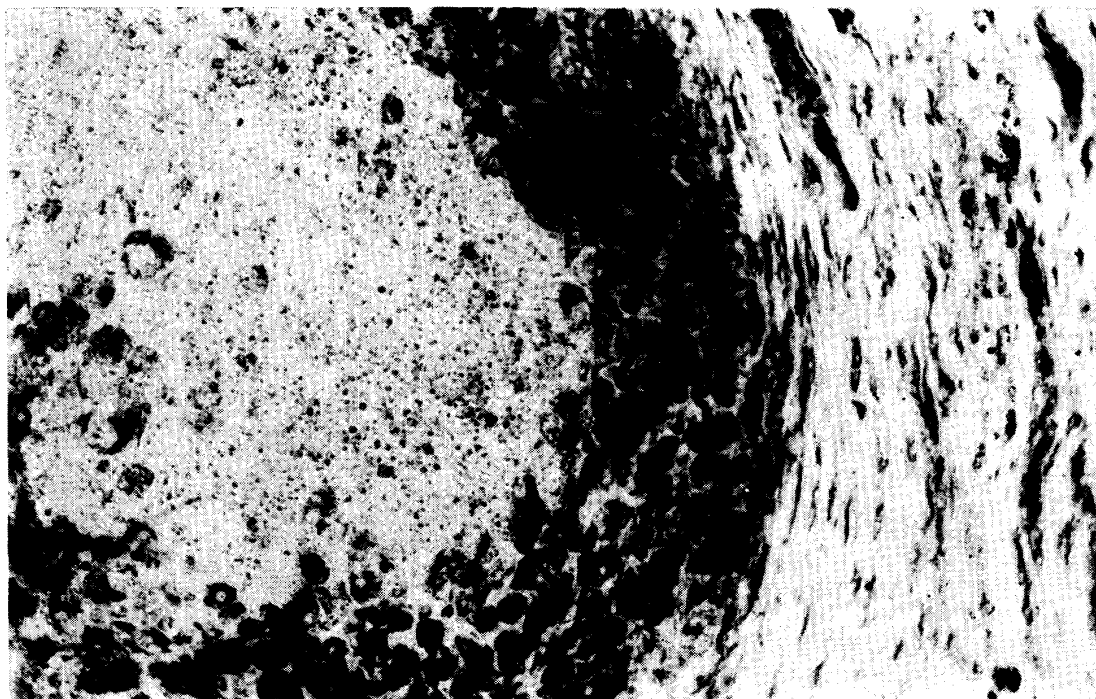
その結果、類上皮細胞では TPN-diaphorase の反応が最も強く、DPN-diaphorase、G-6-P 脱水素酵素、乳酸脱水素酵素等の反応がこれにつぐ。特に皮下組織の結節では 9 週に至っても尚各脱水素酵素反応が強いが、その他の臓器では前段階にあると思われる肺胞喰細胞等に比し、反応が減弱している場合が屢々あり、類上皮細胞化してからその活性減少の勾配が比較的急な様である。而して TPN 系統の反応が DPN 系統のそれに比してよく活性を保持する傾向が強い。

引 用 文 献

1) Seligman, A. M. & A. M. Rutenburg ;

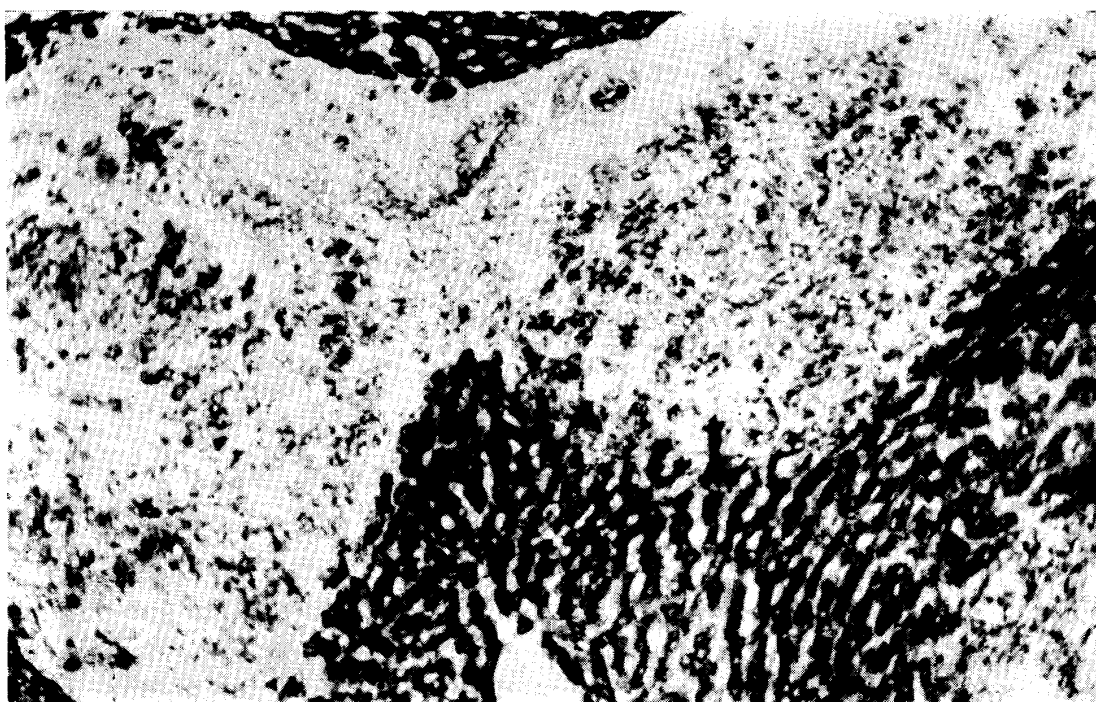
- Science **113** ; 317 1951
- 2) Rutenburg, A. M., M. Wolman & A. M. Seligman ; J. Histochem. & cytochem. **1** . 66, 1953
- 3) Farber, E., H. H. Sternberg & C. E. Dunlap ; Proc.Soc. Exp. Biol. & Med. **86** ; 534, 1954.
- 4) Farber, E. et al ; J. Histochem. & Cytochem. **4** ; 254, 及 347, 1956.
- 5) Nachlas, M. M., D. G. Walker & A. M. Seligman ; J. Biophys. & Biochem. Cytol. **4** ; 29, 1958.
- 6) Pearse, A. G. E. et al ; Ibid. **4** , 747, 1958.
- 7) Pearse, A. G. E. et al ; Ibid. **4** , 1958.
- 8) Wattenberg, D. W. & J. L. Leong ; J. Histochem. & Cytochem. **8** ; 296, 1960.
- 9) Baldwin, E.; Dynamic aspects of biochemistry 1952, Cambridge Univ. Press. p148.
- 10) Zimmerman, H. & A. G. E. Pearse : J. Histochem. & Cytochem. **8** ; 37, 1960.
- 11) Pearse, A. G. E. : Histochemistry. 1960. J. & A Churchill, Ltd. London. p561.
- 12) Dewey, M. M. & J. L. Conklin ; J. Histochem. & Cytochem. **8** ; 347, 1960.
- 13) Conklin J. L., M. M. Dewey & B. May ; Ibid. **10** , 136, 1962.
- 14) Farber, E. & E. Bueding : Ibid. **4** ; 357, 1956.
- 15) Mizutani, A. & K. Hikima ; Acta Tuber. Jap. **11** (1); 17, 1961
- 16) 水谷昭, 大川欣一 ; 京結紀要 **10**(1), 1, 1961.
- 17) Wegmann, R. & C. Tordet-Caridroit ; J. Histochem. & Cytochem. **8** ; 348, 1960.
- 18) Hsu, Y. T. & C. Hoch-Liegti ; Am. J. Path. **29** ; 105, 1953.
- 19) 大根田玄寿 ; 肺結核治療の病理, 青木編, 医学書院 1955.
- 20) 家森武夫 ; 日本臨床結核 **15** ; 466, 1956.
- 21) 菩提寺幹人 ; 日本体質学雑誌 **21** ; 60, 1956.
- 22) 土田康 ; 神戸医大紀要 **10** ; 179, 1957.
- 23) 水谷昭 ; 京結紀要 **8** ; 9, 1959.
- 24) Porter, J. W., S. J. Wakil, A. Tietz., M. I. Jacob & D. M. Gibson ; Biochim. Biophys. Acta. **25** ; 35, 1957.
- 25) Lachance, J. P., G. Popjak & A. de Waard ; Biochem. J. **68** ; 7, 1958.
- 26) Rubinstein, L. J. & B. Smith ; Nature. **193** ; 895, 1962

(昭和37年8月9日受付)



家兎皮下，牛型 Rm 株接種後9週
DPNH. 類上皮細胞及結合組織細胞に強陽性である。

×200



海猿，肝，人型 H₃₇Rv 株接種後9週
TPNH, 類上皮細胞にかなり強い活性を認めるが肝細胞に比し稍々弱い。再生細胆管も陽性である。