

# chymopapain静注後の家兔耳介軟骨の形態学的研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/9015">http://hdl.handle.net/2297/9015</a>

## chymopapain 静注後の家兎耳介軟骨の形態学的研究

金沢大学医学部整形外科科学教室 (主任: 野村 進教授)

中 瀬 裕 介

(昭和57年10月15日受付)

chymopapain を雄幼若家兎の耳静脈より注入し、静注後の耳介の肉眼的観察, toluidine blue spot test による血清および尿中の酸性ムコ多糖の測定, 耳介軟骨の光顕的, 電顕的観察を行った。chymopapain 静注後短時間で、耳介軟骨細胞の変性と軟骨基質の分解が起り、両耳介の下垂が認められた。proteoglycan の分解の結果、遊離した酸性ムコ多糖は血液に吸収され、尿中に排泄されることが証明された。軟骨細胞の変化は可逆的であり、時間の経過とともに細胞は機能を回復し、傷害された軟骨の修復が行なわれ、両耳介の下垂は回復した。以上の耳介軟骨の変性とその回復過程に、膠原線維の増加、走行の乱れ、幅の増大がみられ、軟骨細胞の空胞内に fibrous long spacing 様線維の出現をみた。弾力線維は不連続化、細分化を呈し、軟骨がほぼ修復された時期に弾力線維の増加をみた。

**Key words** chymopapain, rabbit ear cartilage, collagen fiber, proteoglycan, elastic fiber.

crude papain などの蛋白分解酵素を幼若家兎に静注することにより、一過性の両耳介の下垂と軟骨基質における酸性ムコ多糖 (acid mucopolysaccharide 以下 AMPS と略) の減少が起ることが報告されている<sup>1)~4)</sup>。また、in vivo<sup>5)~7)</sup>、in vitro<sup>8)~10)</sup>において、AMPS、proteoglycan が膠原線維の形成に関与することを示唆する報告があり、crude papain 静注後の耳介軟骨の修復過程において、Sheldon ら<sup>11)</sup>はゴルジ空胞内に、Ueda ら<sup>12)</sup>は軟骨基質に fibrous long spacing (以下 FLS と略) 様線維を見出している。

そこで著者は、crude papain の一成分である chymopapain を用い、静注後の家兎耳介軟骨の超微構造的変化を中心に検討した。そして、chymopapain 静注後、軟骨基質における proteoglycan の減少からその修復過程において、異常な膠原線維の出現が細胞内あるいは細胞外にみられるかどうか、また、見出されるならば、このような異常な膠原線維の形成機序を解明するために本研究を行った。

## 材料および方法

実験動物として雄幼若家兎 (体重 800~1,000 g) 26

羽を用いた。20羽は耳静脈より 1% chymopapain (Sigma 社) 1 ml をゆっくり静注し、経時的に両耳介の肉眼的観察を行う一方、そのうちの6羽について血清および尿中の AMPS を測定し、残り 14羽について耳介軟骨の光顕的、電顕的観察を行った。なお、未処理の家兎6羽を対照とした。

## 1. 肉眼的観察

両耳介の下垂の程度を (++)、(+), (-) の3段階に分けた。

## 2. 血清 AMPS の測定

対照および chymopapain 静注後 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 24, 36, 48, 60, 72 時間に採血を行い、分離した血清を蛋白分解酵素で処理後、toluidine blue spot test<sup>13)</sup> (2% 酢酸水 + 0.01% toluidine blue) による metachromasia 反応にて測定した。metachromasia 反応による AMPS の増加を (++)、(+), (-) で表わした。

## 3. 尿中 AMPS の測定

対照および chymopapain 静注後約 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 24, 36, 48, 60, 72, 96, 120 時間に採尿器を用い尿を採取し、toluidine blue spot test にて血

Morphological Studies of Rabbit Ear Cartilage after Administration of Chymopapain.  
Yusuke Nakase, Department of Orthopaedic Surgery, School of Medicine, Kanazawa University.

清と同様 (+), (+), (-) で評価した。

#### 4. 光顕的観察

光顕的観察には、対照および chymopapain 静注後 3, 6, 12, 24, 48, 72 時間と 1 週間の家兎各 2 羽を用いた。動物はエーテル麻酔下に屠殺し、耳介軟骨を 10% 中性ホルマリンにて固定後、hematoxylin-eosin 染色、safranin O 染色<sup>14)</sup>、toluidine blue 染色 (pH 2.5) を行った。また、safranin O 染色による基質の染色性の低下および toluidine blue 染色における metachromasia の低下による AMPS の減少の程度を (+), (+), (-) で表わした。

#### 5. 電顕的観察

対照および実験群の試料の作成は光顕用試料と同様の時間間隔で行った。採取した耳介軟骨は、2% グルタルアルデヒドと 1% オスミウム酸で固定し、エタノール系列で脱水、エボン 812 で包埋した。試料はダイヤモンドナイフを用い LKB 型 ultramicrotome で薄切し、ウラン・鉛の二重染色を行った。一部の試料は弾力繊維の同定のためにタンニン酸染色<sup>15)</sup>を行ない、また、proteoglycan の検出にはルテニウム・レッド染色 (以下 RR 染色と略) を用いた。切片は日本電子 JEM 100-B 型および日立 HU-11 DS 型にて直接倍率 1,000~30,000 倍で観察した。

### 成 績

#### 1. 肉眼的変化

chymopapain 静注後 3 時間頃より両耳介の先端から下垂が進行し、24 時間頃にもっとも著明となった。その後次第に回復し、72 時間から 96 時間頃ではほぼ正常の状態に復した (Fig. 1)。

#### 2. 血清 AMPS の変化

対照では metachromasia 反応は陰性であり、chymopapain 静注後 6 時間より (+) となり、12 時間から 24 時間では (++) であった。また、48 時間以降においては陰性となった。

#### 3. 尿中 AMPS の変化

対照では血清と同様 metachromasia 反応は陰性であり、chymopapain 静注後 9 時間頃より (+) を示し、18 時間頃から 24 時間頃では (++) であった。その後 96 時間頃まで (+) を示し、120 時間以降は再び陰性となった。

#### 4. 光顕的観察

##### 1) 対照群

軟骨膜に近い軟骨細胞は、紡錘形、楕円形を呈し、中央部では円形あるいは卵円形を呈する。safranin O 染色による基質の染色性は中央部では強く、周辺部に行くにしたがい低下する傾向にあり、toluidine blue 染

色による metachromasia も同様の傾向を示した (Fig. 2 a)。

##### 2) 実験群

chymopapain 静注後 6 時間までは著明な変化はみられなかったが、12 時間では軟骨細胞は膨化し、相対的に基質の占める割合が少なくなり、safranin O 染色による基質の染色性の低下、toluidine blue 染色による metachromasia の著明な低下がみられた (Fig. 2 b)。その後、細胞の形態と基質の染色性は徐々に回復し、72 時間では基質の染色性は対照とほぼ同様の強さとなり、1 週間ではほぼ正常軟骨の形態に回復した (Fig. 2 c)。

#### 5. 電顕的観察

電顕的観察にあたって、耳介軟骨を便宜上、軟骨膜に近い側より、(1) 細長い紡錘形の軟骨細胞が 2~3 個軟骨表面に平行に配列している表層、(2) 2~3 個の小型の楕円形、卵円形の軟骨細胞よりなる中層、および (3) 中央部の 4~5 個の大型の円形、卵円形の軟骨細胞よりなる深層の 3 層に分けた。

##### 1) 対照群

##### i) 軟骨細胞

表層の細胞は長楕円形の核を有し、細長く伸びた原形質にはよく発達したゴルジ装置、粗面小胞体と糸粒体、マイクロフィラメント、グリコーゲン顆粒をみる (Fig. 3)。また、一部のゴルジ空胞内には、粒子状物質、フィラメント状物質、無定型物質などの集積がみられた。粗面小胞体の内腔は絮状物質で占められ、内腔の拡大を示すものも多く、小胞膜にはポリゾームパターンを示すリボゾームが附着している。糸粒体は粗面小胞体に接近して存在している。幅約 10 nm のマイクロフィラメントは核の周囲にわずかに集束してみられる程度であった。グリコーゲン顆粒 (直径約 40 nm) はおもに原形質周辺部に存在する。細胞突起は少ない。

中層では、表層の軟骨細胞と同様にゴルジ装置、粗面小胞体の発達は良好であったが、粗面小胞体は管状を呈し、内腔の拡大はほとんどみられなかった (Fig. 4)。マイクロフィラメントの集積は増加し、原形質内に広範囲に認められる。時々、脂肪滴も散見された。細胞突起は比較的発達し、とくに深層側にその伸展傾向をみた。糸粒体、グリコーゲン顆粒は表層細胞のそれらと著しい差異はなかった。

深層の細胞の特徴は、細胞が大きいこと、核を 2 個有する細胞が多いこと、巨大な脂肪滴を有すること、無定型物質を有する空胞が多くみられること、原形質周辺部におけるグリコーゲン顆粒の量的増加がみられることである。そのほか中層の細胞とほとんど差異はなかった (Fig. 5)。

## ii) 細胞間物質

基質は proteoglycan, 膠原線維, 弾力線維が区別される。

proteoglycan はウラニール・鉛染色標本, タンニン染色標本で粒子として観察されるが, RR 染色標本では直径約 20~30 nm の粒子と幅約 5~15 nm の各粒子を結ぶフィラメントとして観察される (Fig. 6)。proteoglycan 粒子は表層では比較的粗であり, 中層, 深層では密にみられた。フィラメントは表層では比較的観察できたが, 中層, 深層では不明瞭であった。また, 各層において, 細胞の周囲では proteoglycan 粒子は大きく, その数は細胞突起の多い細胞周囲では少なく, 細胞突起の発達不良は細胞周囲では多い傾向にあった。

膠原線維は幅約 20~30 nm の一部横紋を有する線維として観察された。表層の一部では, 線維の幅の増大, 量的増加がみられたほか, 各層における膠原線維の幅, 量, 走行などに差異は認めなかった。

弾力線維は軟骨細胞を取り囲むように位置し, 幅約 100~600 nm の線維が帯状, 島状にみられた。ウラニール・鉛染色標本, RR 染色標本では, microfibril に囲まれた電子密度の低い無構造物質として観察されるが, タンニン酸染色標本では特異的に濃染された。弾力線維は量的には中層, 深層に比し表層では少ない傾向にあった (Fig. 7)。

## 2) 実験群

## i) 軟骨細胞の変化

chymopapain 静注後 3 時間では表層および中層の軟骨細胞の細胞突起が増加し (Fig. 8), 6 時間では主に表層細胞の空胞形成が特徴的であった (Fig. 9)。空胞形成は 48 時間においてもみられた。中層および深層においても, 静注後 12 時間で, 軟骨細胞は変性に陥り, 細胞の膨化とともに, 細胞突起, グリコーゲン顆粒, 細胞小器官の減少および脂肪滴の増加がみられた (Fig. 10)。24 時間, 48 時間においても変性細胞が散見されたが, この時期において, ゴルジ装置と粗面小胞体がよく発達した軟骨細胞が各層に出現することが注目された。72 時間から 1 週間では変性した軟骨細胞はほとんどみられず, 各層の細胞とも対照とほぼ同様の像に回復した (Fig. 11)。なお, 以上の過程において, 各層における細胞の数や配列の変化はみられなかった。

## ii) 細胞間物質の変化

## a. proteoglycan

chymopapain 静注後 3 時間では対照と比しほとんど変化はみられなかったが, 6 時間では各層における proteoglycan 粒子の数の減少傾向がみられ, 12 時間では粒子はほとんど消失し, 被覆されていた膠原線維がより明瞭に観察されるようになった (Fig. 12)。その後

次に, proteoglycan の修復が行われ, 72 時間, 1 週間では, 対照とほぼ同様の像を呈するまでに修復された (Fig. 13)。

## b 膠原線維

静注後 6 時間から 72 時間にかけて膠原線維の増加と走行の乱れが部分的に観察され, 12 時間から 48 時間では線維の幅の増大がみられた。12 時間, 24 時間では約 68 nm の周期性横紋を有する直径約 100 nm の太い線維がみられ (Figs. 14, 15), 48 時間では直径が約 200 nm 以上にも達するものが観察された。

また, 静注後 6 時間, 12 時間, 24 時間の表層および中層において, ゴルジ装置, 粗面小胞体の比較的発達した軟骨細胞の空胞内に, 横紋を有する膠原線維の出現をみた。6 時間では空胞内線維の直径は約 70 nm であり, 横紋を認めるが, その周期性は不明であった。空胞内にはほかに, 小胞, 粒子, 無定型物質がみられた (Fig. 16)。12 時間では線維は, 6 時間における線維と同様, ゴルジ装置の近くの空胞内にみられ (Fig. 17), 線維の特徴は, 直径約 150 nm の幅の広い線維であり, substriation の数は少なく, 線維軸に平行に走るフィラメントがみられ, 横紋の周期性は不確かであったが FLS 様線維と考えられた (Fig. 17 a)。空胞内にはほかに, 粒子, 顆粒状物質, 無定型物質などがみられ, 隣接する空胞内にも, 同様の線維の出現をみた (Fig. 17 b)。

## c 弾力線維

静注後 6 時間では, 表層および中層における線維の不連続化が現われ, 24 時間では, 弾力線維は直径約 100 nm の顆粒状に細分化された (Fig. 18)。しかし, タンニン酸染色標本による染色性の低下はみられなかった。48 時間では弾力線維の不連続化, 細分化は徐々に回復し, 72 時間では表層および中層の一部の細胞の周囲で, タンニン酸染色にて強く濃染する弾力線維の増加をみた (Fig. 19)。1 週間では弾力線維は対照とほぼ同様の像を呈していた。

microfibril については, 各染色標本において chymopapain 静注後の経時的変化を明確にとらえることはできなかった。

以上の肉眼的変化, 血清および尿中 AMPS の変化, 光顕的, 電顕的観察結果を総括すると Table 1 に示すとおりである。

## 考 察

crude papain を幼若家兎に静注することにより, 両耳介の下垂, 血清および尿中への AMPS の排泄の増加, 光顕的, 電顕的観察による軟骨基質からの AMPS および proteoglycan の減少などの一過性の諸変化がみられることが報告されてきた。そして, 一方ではこのよう

Table 1. Changes of auricular cartilage after administration of chymopapain

	before injection	After injection						
	Control	3	6	12	24	48	72	168(hrs)
Macroscopic finding								
Drooping of both auricles	-	+	+	+	+	+	+	-
Increase in serum acid mucopolysaccharides	-	-	+	+	+	-	-	-
Increase in urine acid mucopolysaccharides	-	-	-	+	+	+	+	-
Light microscopic finding								
Reduction in acid mucopolysaccharides	-	-	-	+	+	+	-	-
Electron microscopic finding								
Increase in cell projections	-	+	-	-	-	-	-	-
Appearance of chondrocytes with many vacuoles	-	-	+	+	+	+	-	-
Swelling of chondrocytes	-	-	-	+	+	+	-	-
Decrease in proteoglycan	-	-	+	+	+	+	-	-
Increase and disturbance of collagen fibers	-	-	+	+	+	+	+	-
Increase in the diameter of collagen fibers	-	-	-	+	+	+	-	-
Appearance of intracytoplasmic collagen fiber	-	-	+	+	+	-	-	-
Discontinuation and fragmentation of elastic fibers	-	-	+	+	+	+	-	-
Augmentation of number of elastic fibers	-	-	-	-	-	-	+	-

な現象を惹起させる蛋白分解酵素についての検索，他方ではこの現象を解明するために形態学的検索，生化学的検索，免疫学的検索が行われている。すなわち，この現象を惹起させる蛋白分解酵素については，Thomas<sup>1)</sup>は crude papain の成分である crystalline papain protease, crystalline papain lysosome, chymopapain について検索を行い，前 2 者ではこの現象がみられないことより，chymopapain がこの現象を惹起させるものと考えた。しかしながら，McClusky ら<sup>2)</sup>は，酸化あるいは sulfhydryl blocking agent により不活化した crystalline papain protease や不活化した blomelin でもこのような現象がみられることにより，不活性型の蛋白分解酵素でも，軟骨基質内に容易に拡散し，組織内で活性化されることにより，このような現象を起こすことができると述べている。

また，crude papain 静注後の血清および尿中への AMPS の排泄の増加については，carbazole 反応にて測定を行った Bryants ら<sup>16)</sup>の報告や S<sup>35</sup>- sulfate を用いた Tsaltas<sup>17)</sup>の報告があり，toluidine blue spot test にて定性的に検索した本研究結果とほぼ同様の成績が報告されている。

光顕的観察結果についても，Thomas<sup>1)</sup>，Spicer ら<sup>2)</sup>

により，細胞の膨化と基質における AMPS の減少がみられることが報告されており，さらに，超微構造的変化についても，crude papain を用いた Sheldon ら<sup>18)</sup>，Ueda ら<sup>12)</sup>の報告があるが，なお不明確な点が多い。以下，chymopapain 静注後の超微構造的変化を中心に考察を加える。

#### 1. 軟骨細胞の変化

chymopapain 静注後にみられた軟骨細胞の主な変化は，静注後初期における表層および中層の細胞の細胞突起の増加と，続いてみられた空胞形成である。深層の細胞ではゴルジ装置，粗面小胞体などの発達が低下し，細胞突起，グリコーゲン顆粒の減少，細胞の膨化，および脂肪滴の増加などを伴った変性軟骨細胞が出現した。時間の経過とともに，ゴルジ装置，粗面小胞体の発達した軟骨細胞が多くみられるようになり，同時に組織の修復が活発に行われた。このような組織の修復が活発に行われている過程において，軟骨膜に近い表層細胞の数の増加や配列の乱れなどがみられなかったことより，このような組織の修復は軟骨膜細胞の再生によって営まれるのではなく，chymopapain による細胞変性は可逆的であり，時間的経過とともに機能を回復した軟骨細胞によって，傷害された軟骨基質が

修復されるものと考えられる。

## 2. 細胞間物質の変化

### 1) proteoglycan

本研究においてみられた proteoglycan の変化は、初期における proteoglycan の減少とその後の活発な proteoglycan の修復であった。軟骨 proteoglycan は、Heinegård ら<sup>19)20)</sup>によれば、軸蛋白に結合したコンドロイチン 4/6 硫酸とケラタン硫酸によって構成され、この proteoglycan はさらにヒアルロン酸と link protein で結合し、巨大な proteoglycan 凝集物を形成していると考えられている。電顕的には、試料作成過程における固定などの操作により、proteoglycan が変形・凝集するため、粒子および各粒子を結ぶフィラメントとして観察される<sup>21)</sup>。また、Horwitz ら<sup>22)</sup>によれば、リボゾームで合成された軸蛋白が粗面小胞体を通する段階でキシロース、ガラクトースなどの結合部位のオリゴ鎖が合成され、その後 proteoglycan 分子がゴルジ装置へ移行し、二糖鎖くり返し部分が伸張し、硫酸化が行われ、ゴルジ小胞と形質膜との融合によってできた通路を経て、細胞外に分泌されると考えられている。

chymopapain 静注後の proteoglycan の減少の原因については、静注された chymopapain の一部、多分不活性型の chymopapain が軟骨基質に拡散し、そこで活性化される。そして、Stern<sup>23)</sup>の述べるごとく proteoglycan, proteoglycan 凝集物の軸蛋白, link protein を分解することにより、AMPS が遊離し、一部が血液に吸収され、尿中に排泄された結果、基質における proteoglycan の減少を招くものと考えられる。その後、変性に陥った軟骨細胞が回復し、活発な proteoglycan の生合成を行った結果、除々に基質における proteoglycan の修復がなされたものと考えられる。

Thomas<sup>1)</sup>, Tsaltas<sup>17)</sup>はこのような基質における proteoglycan の変化が一過性の耳介の下垂の原因であると述べている。本研究においても、proteoglycan の減少と修復の時期が、耳介の下垂とその回復の時期にほぼ一致すること、また、Dorfman<sup>24)</sup>の述べるごとく、proteoglycan が組織の形態保持に関与していることより、proteoglycan の減少が耳介の下垂の主要な原因と考えられる。

### 2) 膠原線維

Sussman<sup>25)</sup>によるヒト髄核の chymopapain を用いた消化試験では、chymopapain は膠原線維に直接的に作用しないとされている。本研究においては、chymopapain を静注することにより、中層に限局して、膠原線維の増加、走行の乱れ、および線維の幅の増大がみられ、また、表層および中層の軟骨細胞の空胞内に膠原線維の出現がみられた。

膠原線維は細胞で合成されたプロコラゲンが、exocytosis によって細胞外に分泌され、プロコラゲンペプチターゼによってプロペプチドが切断され、トロポコラゲンに変わった後、分子内、分子間架橋が進行して形成されるとされている<sup>26)</sup>。しかしながら、膠原線維がコラゲン合成細胞内で観察されたという報告もまれではない。

Usuku ら<sup>27)</sup>, Gona<sup>28)</sup>はカエルの幼生変態時の間葉系細胞内に、Pérez - Tamayo<sup>29)</sup>はカラギニン肉芽腫のコラゲン吸収時の線維芽細胞内に、Ten Cate<sup>30)</sup>はモルモットの臼歯々根膜の線維芽細胞内に膠原線維を見出している。また、Sheldon ら<sup>14)</sup>は、crude papain 静注後の軟骨組織の修復過程において、ゴルジ空胞内に約 200 nm の周期性横紋を有する FLS 様線維を見出している。そのほか、細胞内に膠原線維を見出した報告としては、Meek<sup>31)</sup>は *Helix aspersa* の線維芽細胞内に、Welsh<sup>32)</sup>はヒトの desmoid fibromatosis の線維芽細胞内に、Göthlin ら<sup>33)</sup>はラット骨折時の仮骨の骨芽細胞内に、Trelsted<sup>34)</sup>は初期鶏胎の角膜上皮細胞のゴルジ空胞内に、Carlson<sup>35)</sup>は脊索上皮細胞内に、Allegra ら<sup>36)</sup>はヒトの desmoid fibrblastoma の線維芽細胞内に、Imura ら<sup>37)</sup>はヒトの二次性分化型軟骨肉腫細胞のゴルジ空胞内に segment long spacing 線維を見出している。

著者も chymopapain 静注後 6 時間、12 時間、24 時間の軟骨細胞の空胞内に膠原線維を見出した。その細胞内膠原線維の形成機序については、chymopapain 静注後の特殊な条件下で、空胞内におけるコラゲン分子と AMPS の特殊な相互作用の結果、空胞内でのコラゲン分子の凝集に至適な状態が惹起され、線維形成が進行したものと推測した。その理由は次の通りである。

(1) 細胞内線維がみられた時期は、基質における proteoglycan の減少とその修復過程に相当し、細胞内での proteoglycan の生合成の促進が予想されること、

(2) 空胞内に線維を有する細胞はいずれもゴルジ装置や粗面小胞体が比較的発達した細胞であり、線維を有する空胞はいずれもゴルジ装置の近くに位置し、空胞内には proteoglycan 粒子と思われる粒子状物質がみられ、また、空胞の周囲には管状の粗面小胞体が多く観察され、その一部が空胞と連続していると思われる像がみられること、

(3) 線維を内包する細胞の周辺部では、膠原線維の分解の証拠はなく、貧食による細胞外線維の取り込みとは考え難いこと、

(4) 空胞内の線維は、とくに 12 時間のものでは、線維の幅が約 150 nm と太く、長周期性横紋を有すると考えられ、substriation の数は少なく、線維軸に平行に走るフィラメントがみられることより、この線維は FLS

様線維の形態学的特徴を有している。そして、このような FLS 線維の *in vitro* でのコラーゲン溶液からの合成には、Highberger ら<sup>38)</sup>、Kajikawa<sup>39)</sup>、Wood<sup>40)</sup>によれば、イオン強度、pH、温度などの各種因子のほかに、AMPS、proteoglycan などがとくに重要な因子であると指適されていること。

次に、細胞外にみられた幅の広い膠原線維の出現についてみると、Wood<sup>41)</sup>によれば、線維形成はトロポコラーゲンによる核形成と核を中心とするコラーゲン分子の凝集による線維への成長という2段階からなるとされており、Lowther ら<sup>42)</sup>、Seegmiller ら<sup>43)</sup>、Oegema ら<sup>9)</sup>は核形成は AMPS や proteoglycan により促進されるが、その後の線維への成長は抑制されると述べている。そして、Thyberg ら<sup>44)</sup>はモルモット骨端軟骨の papain による酵素処理の結果、Campo ら<sup>45)</sup>はウシ肋軟骨に塩酸グアニジンを作用させることにより、軟骨基質における proteoglycan の減少とともに正常のものより幅の広い膠原線維がみられることを報告している。さらに、Seegmiller ら<sup>43)</sup>は chondrodystrophy を呈する突然変異マウスでは、軟骨基質における AMPS の減少と幅の広い膠原線維が出現することを報告し、また、前述した Ueda ら<sup>13)</sup>も crude papain 静注後、proteoglycan の減少とともに膠原線維の幅が増大することを述べている。

本研究において、幅の広い膠原線維は chymopapain 静注後 12 時間、24 時間、48 時間にみられ、この時期は前述したように基質における proteoglycan の活発な修復が行われていると考えられるが、なお、基質における proteoglycan の減少がみられる時期に相当することより、proteoglycan の減少が膠原線維の集束を促進した結果、このような幅の広い膠原線維が出現したものと考えたい。しかし、このような幅の広い膠原線維は各層のあらゆる部位に出現するわけではなく、ゴルジ装置、粗面小胞体の比較的発達した中層の軟骨細胞に接して限局してみられること。また、Gay ら<sup>46)</sup>の指適するように、軟骨細胞は II 型コラーゲンのほかに、病的状態では I 型コラーゲンも分泌することが知られていることより、このような軟骨細胞からは I 型コラーゲンが分泌され、その結果このような幅の広い膠原線維が形成された可能性がある。

### 3) 弾力線維

本研究において、Sheldon ら<sup>18)</sup>の述べる弾力線維の消失、あるいは Ueda ら<sup>12)</sup>の述べる弾力線維の電子密度の低下などは認められなかったが、chymopapain 静注後 6 時間から 48 時間では、弾力線維の不連続化、顆粒状の細分化を認めた。この原因としては、北田<sup>47)</sup>によるニワトリ胚大動脈の弾力線維のエラスターゼ酵素消化試

験にみられる弾力線維の細分化像と所見が類似していることより、蛋白分解酵素である chymopapain の直接的な作用も考慮されるが、この時期は基質における proteoglycan の減少がみられる時期に相当することより、proteoglycan の減少が弾力線維の不連続化、細分化をもたらした可能性も否定できないと考えられる。また、静注後 72 時間の表層および中層の一部にみられた弾力線維の増加については、この時点では基質における proteoglycan の修復がほぼ完了した時期に相当することより、ある細胞ではエラスチン前駆物質の分泌が亢進した結果、弾力線維の増加が招来されたものと推測される。

## 結 論

chymopapain を雄幼若家兎耳静脈に注入し、静注後の耳介の肉眼的観察、toluidine blue spot test による血清および尿中 AMPS の測定、耳介軟骨の顕微鏡的観察を行い、以下の結論をえた。

1. chymopapain 静注後 3 時間頃より、両耳介の下垂がみられ、その後、血清および尿中への AMPS の排泄の増加、軟骨基質における AMPS、proteoglycan の減少がみられた。両耳介の下垂は、軟骨基質における proteoglycan の減少によるものと考えた。

2. 静注後の軟骨細胞の変化は、初期における細胞突起の増加と、続いてみられる空胞形成と軟骨細胞の変性であった。しかし、これらの変化は可逆的であり、時間の経過とともに細胞は機能を回復し、傷害された軟骨の修復を行うものと考えられた。

3. 軟骨細胞の回復過程において、細胞空胞内に FLS 様線維が見られた。この原因については、空胞内におけるコラーゲン分子と AMPS との相互作用の結果、線維形成が行われたものと推測した。

4. 軟骨基質に幅の広い膠原線維の出現がみられた。この線維の形成機序については、たんなる基質における proteoglycan の減少の結果というより、その出現部位が限局していることより、正常とは異なった軟骨コラーゲンが特定の軟骨細胞より分泌される可能性が考えられた。

5. 軟骨基質の分解とともに、弾力線維の不連続化、細分化がみられたが、この変化は chymopapain による直接的な作用と基質における proteoglycan の減少による可能性が考えられた。その後みられた弾力線維の増加については、細胞におけるエラスチン前駆物質の分泌の亢進によるものと考えた。

## 謝 辞

稿を終るにあたり、ご指導ならびにご校閲いただきました

金沢大学整形外科教室野村進教授に深謝します。また、本研究を直接ご指導およびご教示くださいました福井医科大学整形外科教室井村慎一教授に感謝します。さらに、ご助言ならびにご校閲いただきました金沢大学第一病理学教室梶川欽一郎教授に心より謝意を表します。また、研究遂行に際しご協力を頂きました同第一病理学教室中西功夫助教授、ならびに安田俊久技官、横田輝一技官に厚く御礼申し上げます。(なお、本論文の要旨の一部は、第54回中部日本整形外科学会、および第12回日本臨床電子顕微鏡学会において発表した。)

### References

- 1) Thomas, L.: Reversible collapse of rabbit ears after intravenous papain, and prevention of recovery by cortisone. *J. Exp. Med.*, **104**, 245 - 252 (1956).
- 2) Spicer, S. S. & Bryant, J. H.: Cartilage changes in papain-treated rabbits. *Am. J. Path.*, **33**, 1237 - 1245 (1957).
- 3) McCluskey, R. T. & Thomas, L.: The removal of cartilage matrix. *in vivo*, by papain. Identification of crystalline papain protease as the cause of the phenomenon. *J. Exp. Med.*, **108**, 371 - 387 (1958).
- 4) McElligott, T. F. & Potter, J. L.: Increased fixation of sulfur<sup>35</sup> by cartilage *in vitro* following depletion of the matrix by intravenous papain. *J. Exp. Med.*, **112**, 743 - 751 (1960).
- 5) Myers, D. B., Highton, T. C. & Rayns, D. G.: Ruthenium red-positive filaments interconnecting collagen fibrils. *J. Ultrastruct. Res.*, **42**, 87 - 92 (1973).
- 6) Trelstad, R. L., Hayashi, K. & Toole, B. P.: Epithelial collagens and glycosaminoglycans in the embryonic cornea. Macromolecular order and morphogenesis in the basement membrane. *J. Cell Biol.*, **62**, 815 - 830 (1974).
- 7) Borcharding, M. S., Blacik, L. J., Sitting, R. A., Bizzell, J. W., Breen, M. & Weinstein, H. G.: Proteoglycans and collagen fibre organization in human corneal scleral tissue. *Exp. Eye Res.*, **21**, 59 - 70 (1975).
- 8) Öbrink, B.: The influence of glycosaminoglycans on the formation of fibers from monomeric tropocollagen *in vitro*. *Eur. J. Biochem.*, **34**, 129 - 137 (1973).
- 9) Oegema, T. R., Laidlaw, J., Hascall, V. C. & Dziewiatkowski, D. D.: The effect of proteoglycans on the formation of fibrils from collagen solutions. *Arch. Biochem. Biophys.*, **170**, 698 - 709 (1975).
- 10) Anderson, J. C., Labeledz, R. I. & Kewley, M. A.: The effect of bovine tendon glycoprotein on the formation of fibrils from collagen solutions. *Biochem. J.*, **168**, 345 - 351 (1977).
- 11) Sheldon, H. & Kimball, F. B.: Studies on cartilage. III. The occurrence of collagen with in vacuoles of the Golgi apparatus. *J. Cell Biol.*, **12**, 599 - 613 (1962).
- 12) Ueda, M., Kitaoka, M., Inouye, S. & Usuku, G.: An Ultrastructural study on the ear cartilage of rabbits after the administration of papain. Appearance of cross-striated collagen segments of an atypical FLS-type. *Virchows Arch. (pathol. Anat.)*, **390**, 139 - 150 (1981).
- 13) 鈴木義之: ムコ多糖体代謝異常の検査. *日本臨床*, **37**, 262 - 263 (1979).
- 14) 広谷速人: 軟骨のサフラニンO染色について. *臨整外*, **11**, 1112 - 1116 (1976).
- 15) Kajikawa, K., Yamaguchi, T., Katsuda, S. & Miwa, A.: An improved electron stain for elastic fibers using tannic acid. *J. Electron Micro.*, **24**, 287 - 288 (1975).
- 16) Bryant, J. H., Leder, I. G. & Stetten, D.: The release of chondroitin sulfate from rabbit cartilage following the intravenous injection of crude papain. *Arch. Biochem. Biophys.*, **76**, 122 - 130 (1958).
- 17) Tsaltas, T. T.: Papain-induced changes in rabbit cartilage. Alterations in the chemical structure of the cartilage matrix. *J. Exp. Med.*, **108**, 507 - 513 (1958).
- 18) Sheldon, H. & Robinson, R. A.: Studies on cartilage. II. Electron microscope observations on rabbit ear cartilage following the administration of papain. *J. Biophysic. Biochem. Cytol.*, **8**, 151 - 163 (1960).
- 19) Heinigard, D. & Hascall, V. C.: Aggregation of cartilage proteoglycans. III. Characteristics of the proteins isolated from trypsin digests of aggregate. *J. Biol. Chem.*, **249**, 4250 - 4256 (1974).
- 20) Heinigard, D. & Axelsson, I.: Distribution of keratan Sulfate in cartilage proteoglycans. *J. Biol. Chem.*, **252**, 1971 - 1979 (1977).
- 21) Kajikawa, K.: *Biochemistry and Pathology of connective tissue* (ed. Y. Otaka). 180 - 221, Igaku

Shoin Ltd., Tokyo, 1973.

- 22) **Horwitz, A. L. & Dorfman, A.** : Subcellular sites for synthesis of chondromucoprotein of cartilage. *J. Cell Biol.*, **38**, 358 - 368 (1968).
- 23) **Stern, I.** : Biochemistry of chymopapain. *Clin. orthop.*, **67**, 42 - 46 (1969).
- 24) **Dorfman, A.** : Studies on the biochemistry of connective tissue. *Am. Acad. Pediat. Proc.*, 576 - 589 (1958).
- 25) **Sussman, B. J.** : Experimental intervertebral discolysis. A critique of collagenase and chymopapain applications. *Clin. Orthop.*, **80**, 181 - 190 (1971).
- 26) **Bornstein, P., Mark, K., Wyke, A. W., Ehrlich, H. P. & Monson, J. M.** : Characterization of the pro- $\alpha 1$  chain of procollagen. *J. Biol. Chem.*, **247**, 2808 - 2813 (1972).
- 27) **Usuku, G. & Gross, J.** : Morphologic studies of connective tissue resorption in the tail fin of metamorphosing bullfrog tadpole. *Develop. Biol.*, **11**, 352 - 370 (1965).
- 28) **Gona, A. G.** : Light and electron microscopic study on thyroxine - induced in vitro resorption of the tadpole tail fin. *Z. Zellforsch.*, **95**, 483 - 494 (1969).
- 29) **Pérez-Tamayo, R.** : Collagen resorption in carrageenin granulomas. II. Ultrastructure of collagen resorption. *Lab. Invest.*, **22**, 142 - 159 (1970).
- 30) **Ten Cate, A. R.** : Morphological studies of fibrocytes in connective tissue undergoing rapid remodelling. *J. Anat.*, **112**, 401 - 414 (1972).
- 31) **Meek, G. A.** : Intracellular collagen fibers. *J. Anat.*, **99**, 3p - 4p (1965).
- 32) **Welsh, R. A.** : Intracytoplasmic collagen formations in desmoid fibromatosis. *Amer. J. Pathol.*, **49**, 515 - 535 (1966).
- 33) **Göthlin, G. & Ericsson, J. L. E.** : Electron microscopic studies of cytoplasmic filament and fibers in different cell type of fracture callus in the rat. *Virchows Arch. (Zell path.)*, **6**, 24 - 37 (1970).
- 34) **Trelsted, R. L.** : Vacuoles in the embryonic chick corneal epithelium, which produces collagen. *J. Cell Biol.*, **48**, 689 - 694 (1971).
- 35) **Carlson, E. C.** : Periodic fibrillar material in membrane-bound bodies in notochordal epithelium of the early chick embryo. *J. Ultrastruct. Res.*, **42**, 287 - 297 (1973).
- 36) **Allegra, S. R. & Brodeick, P. A.** : Desmoid fibroblastoma. Intracytoplasmic collagen synthesis in a peculiar fibroblastic tumor : Light and ultrastructural study of a case. *Hum. Pathol.*, **4**, 419 - 429 (1973).
- 37) **Imura, S., Tanaka, S. & Takase, B.** : Intracytoplasmic segment long spacing fibrils in chondrosarcoma. *J. Electron Micro.*, **24**, 87 - 95 (1975).
- 38) **Highberger, J. H., Gross, J. & Schmitt, F. O.** : The interaction of mucoprotein with soluble collagen ; An electron microscope study. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **37**, 286 - 291 (1951).
- 39) **Kajikawa, K.** : Electron microscopic observations on reconstituted fibrils from dissolved collagen. *Acta. Pathol. Japonica*, **6**, 37 - 49 (1956).
- 40) **Wood, G. C.** : The formation of fibrils from collagen solutions. 3. Effect of chondroitin sulphate and some other naturally occurring polyanions on the rate of formation. *Biochem. J.*, **75**, 605 - 612 (1960).
- 41) **Wood, G. C.** : The formation of fibrils from collagen solutions. 2. A mechanism of collagen-fibril formation. *Biochem. J.*, **75**, 598 - 605 (1960).
- 42) **Lowther, D. A. & Toole, B. P.** : Interaction of proteoglycans with tropocollagen. *Chemistry and molecular biology of the intercellular matrix* (Balazs, E. A., ed), Vol. **2**, 1135 - 1153, Academic Press, London, 1970.
- 43) **Seegmiller, R., Fraser, F. & Shelton, H.** : A new chondrodystrophic mutant in mice. Electron microscopy of normal and abnormal chondrogenesis. *J. Cell Biol.*, **48**, 580 - 593 (1971).
- 44) **Thyberg, J. & Friberg, U.** : Ultrastructure of the epiphyseal plate of the normal guinea pig. *Z. Zellforsch.*, **122**, 254 - 272 (1971).
- 45) **Campo, R. D. & Phillips, S. J.** : Electron microscopic visualization of proteoglycans and collagen in bovine costal cartilage. *Calc. Tiss. Res.*, **13**, 83 - 92 (1973).
- 46) **Gay, S., Müller, P. K., Lemmen, C., Remberger, K., Matzen, K. & Kühn, K.** : Immunohistological study on collagen in cartilage - bone metamorphosis and degenerative osteoarthritis. *Klin. Wschr.*, **54**, 969 - 976 (1976).
- 47) **北田博久** : ニワトリ胚大動脈の礎質と弾力線維の

電子顕微鏡的研究, 十全医会誌, 84, 513 - 529 (1975).

### Explanation of figures

- Fig. 1. Macroscopic finding of rabbit ear. Drooping of both ears is most remarkable 24 hours after administration of chymopapain.
- Fig. 2. Light microscopic finding of rabbit ear cartilage. The control shows better stainability of the matrix (a); 12 hours, swelling of chondrocytes and deficit in stainability (b); stainability is improved to normal level 72 hours after administration of chymopapain (c). Safranin O stain.  $\times 100$
- Figs. 3 - 19 Electron microscopic finding of rabbit ear cartilage.
- Fig. 3. Normal ear cartilage in superficial layer (control). Chondrocytes show spindly shape, and Golgi apparatus and rough endoplasmic reticulum are well developed. Uranyl and lead stain.  $\times 6,000$
- Fig. 4. Normal ear cartilage in middle layer (control). Chondrocytes show elliptical shape, and numerous microfilaments are seen around nucleus. Uranyl and lead stain.  $\times 6,000$
- Fig. 5. Normal ear cartilage in deep layer (control). Chondrocytes show large and oval shape, much of them with double nucleus. Numerous glycogen granula are seen in the marginal area. Uranyl and lead stain.  $\times 6,000$
- Fig. 6. Normal ear cartilaginous matrix in deep layer (control). Round and original ruthenium - red positive particles about 20 to 30 nm in diameter are scattered, and filaments 5 to 15 nm in width also are seen. Collagen fibers about 20 to 30 nm in diameter are seen as well. Ruthenium red stain.  $\times 60,000$
- Fig. 7. Normal ear cartilage in deep layer (control). Appearance of islet - shaped or sash - shaped elastic fibers around chondrocytes. Tannic acid stain.  $\times 6,000$
- Fig. 8. Increase in cell projections of chondrocytes. Middle layer of ear cartilage 3 hours after administration of chymopapain. Uranyl and lead stain.  $\times 4,000$
- Fig. 9. Appearance of chondrocytes with many vacuoles. Superficial layer of ear cartilage 6 hours after administration of chymopapain. Tannic acid stain.  $\times 4,000$
- Fig. 10. Appearance of degenerated chondrocytes. Deep layer of ear cartilage 12 hours after administration of chymopapain. Uranyl and lead stain.  $\times 3,000$
- Fig. 11. Recovery of degenerated chondrocytes. Chondrocytes of middle layer 72 hours after administration of chymopapain. Tannic acid stain.  $\times 4,000$
- Fig. 12. Disappearance of most ruthenium - red positive particles. Deep layer of ear cartilaginous matrix 12 hours after administration of chymopapain. Ruthenium red stain.  $\times 60,000$
- Fig. 13. Reappearance of ruthenium - red positive particles. Deep layer of ear cartilaginous matrix after a week from administration of chymopapain. Ruthenium red stain.  $\times 60,000$
- Fig. 14. Disturbance of the arrangement of collagen fibers. Middle layer of ear cartilage 12 hours after administration of chymopapain. Ruthenium red stain.  $\times 60,000$
- Fig. 15. Appearance of collagen fibers about 100 nm in diameter. Middle layer of ear cartilage 24 hours after administration of chymopapain. Tannic acid stain.  $\times 30,000$
- Fig. 16. Appearance of collagen fiber in vacuole. Chondrocytes in middle layer 6 hours after administration of chymopapain. Tannic acid stain.  $\times 60,000$
- Fig. 17. Appearance of fibrous long spacing - like fibers in Golgi vacuoles. Chondrocyte in middle layer 12 hours after administration of chymopapain. Uranyl and lead stain.  $\times 12,000$ . (a and b : higher magnification.  $\times 60,000$ )
- Fig. 18. Discontinuation and fragmentation of elastic fibers. Middle layer of ear cartilage 24 hours after administration of chymopapain. Tannic acid stain.  $\times 15,000$
- Fig. 19. Augmentation of number of elastic fibers. Superficial and middle layers of ear cartilage 72 hours after administration of chymopapain. Tannic acid stain.  $\times 4,000$

**Morphological Studies of Rabbit Ear Cartilage after Administration of Chymopapain** Yu-suke Nakase, Department of Orthopaedic Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 – J. Jusen Med, Soc., **91**, 859–875 (1982)

**Key words:** chymopapain, rabbit ear cartilage, collagen fiber, proteoglycan, elastic fiber.

#### **Abstract**

After chymopapain was injected into the auricular vein of young male rabbits, studies were carried out on macroscopic observation of the auricle, determination of the acid mucopolysaccharides in the serum and urine by the toluidine blue spot test, and light and electron microscopies of the auricular cartilage. Degeneration of the chondrocytes and disintegration of the cartilaginous matrix occurred and drooping of both auricles were observed, shortly after the injection of chymopapain. It was demonstrated that released acid mucopolysaccharides were absorbed by the blood and excreted in the urine after the breakdown of proteoglycan in the cartilaginous matrix. The changes in the chondrocytes were reversible: with the passage of time, function of the chondrocytes was recovered, injured cartilage was restored, and the drooping of both auricles returned to the normal. During the degeneration and recovery process of the auricular cartilage an increase in collagen fibers, disturbance of the arrangement, and increase in the diameter were observed and the appearance of fibrous long spacing-like fibers was observed in the vacuoles of the chondrocytes. Elastic fibers became discontinuous and fragmented but, by the time the cartilage had been restored, augmentation of their number was seen.

1



2













