

カラギニン肉芽腫におけるコラゲン分解に関する研究

〔Ⅲ〕カラギニン-コラゲン複合体のコラゲナーゼ 及びライソゾーム酵素活性に及ぼす影響

金沢大学医学部病理学第一講座（指導：梶川欽一郎教授）

近 藤 勝 彦

（昭和47年6月15日受付）

第二報においてカラギニンはコラゲン分子と相互作用をおこし、SLS及びFLS線維を形成し得ることを証明した。ところで、同じ現象が生体内でも起るか、また、もしおこるとすればこのような相互作用がカラギニン肉芽腫におけるコラゲン分解とどのような関係をもつかの検索が重要な課題となる。この問題を解明するために、*in vitro* でつくったカラギニンとコラゲンの複合体をラット皮下に注射し、その変化を光顕的及び電顕的に観察し、また組織におけるライソゾーム酵素とコラゲナーゼの産生状態を生化学的に検索した。

材料及び方法

I. カラギニン-コラゲン複合体による肉芽腫

第二報に記載したと同様な方法で0.5%コラゲン溶液に0.1%カラギニン溶液（ただし、カラギニン溶液は煮沸滅菌したカラギニン水溶液に酢酸を加えて0.1%溶液としたもの）を0.01%の割合に加え、30,000g, 30分遠心すると、白色沈澱がえられる。これをカラギニン-コラゲン複合体（CCC）とする。CCCは第二報に述べたように直径100Å以下の細線維からなる。CCCを0.05%酢酸で3回洗った後、生食水に懸濁し、この液の5mlをWister系ラット（体重100g）の皮下に注射し、3, 7, 15, 30日目の肉芽腫を材料として用いた。

II. カルボキシメチルセルロース（CMC）による肉芽腫

重合度約500のCMC（東京化成社）の2%生食水溶液5mlをラット皮下に注射し、3, 7, 14, 21日目の肉芽腫を材料として用いた。

III. 形態学的検査

上記の肉芽腫を光顕的及び電顕的に検査した。光顕的観察のためには、10%ホルマリン固定し、パラフィン切片を作製し、Gomori 銀、トルイジン青染色を施し、電顕的観察のためには、2%グルタルアルデヒド（cacodylate buffer pH7.4）と2%オスミウム酸（veronal acetate buffer pH7.4）の2重固定後、エボン812包埋し、切片はウラニール、鉛の重染色を行なった。

試料は日本電子JEM-7型電子顕微鏡を用い、直接倍率3,000~10,000で観察した。

IV. ホモジネートの作製

CCC肉芽腫及びCMC肉芽腫（0.6g）について、コラゲナーゼを活性を検する目的には、生食水を、ライソゾーム酵素を検出する目的には、1mMEDTAを含む0.25M蔗糖を10倍量（v/w）を加えて、Waring blenderの最高速度で10秒間づつ、4回ホモジナイゼーションを行なった。

V. 酵素の測定

1. コラゲナーゼ活性測定

上記のホモジネートをpH5における等電点沈澱法により、上清と沈澱にわけたもの及びホモジネートを遠心して上清と沈澱にわけたものを用いた。いずれの試料も1mMのCaCl₂を含むTris-HCl緩衝液に24時間透析した後被検液とした。

コラゲナーゼ活性は100μCiの¹⁴C-グリシンをラットの腹腔に注射し、真皮からKangらの方法¹⁾によって抽出した中性塩可溶性コラゲン（比放射能22,000cpm/mg）を基質として、Lazarusらの方法²⁾により定量した。

Studies on collagenolysis in carrageenin granuloma III. Effect of carrageenin-collagen complex on activity of collagenase and lysosomal enzymes **Katsuhiko Kondo**. Department of Pathology(I) (Director : Prof. K. Kajikawa) School of Medicine, Kanazawa University.

このコラーゲンと被検液を37°C, 18時間 incubate した後, 100,000g, 1時間遠心して得られた上清0.5 mlに0.5mlの1.0M-NaOHを加え, 60°C, 2時間の加熱によりタンパク質を可溶化し, この溶液0.5mlを20 mlのBrayの溶液³⁾に加え液体シンチレーションカウンターで測定した。

2. ライソゾーム酵素測定

上記のホモジネートを10回凍結融解した後, モスリンでろ過し, タンパク含量が120~200 μ gになるように緩衝液を加えたものを用いた。タンパク含量はLowryらの方法⁴⁾により定量した。

1) β -glucosidase は p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (Calbiochem 社), β -galactosidase は p又は O-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (Sigma 社) 基質として, Beckらの方法⁵⁾に準じて測定した。0.5mlの冷40%トリクロル酢酸を加えて反応を止め, 10,000g, 20分遠心し, 上清1mlに1.5mlの2.0M-NH₄OHを加えて(pH10.6)遊離したP又は O-nitrophenol を定量した。

2) 酸性フォスファターゼは第一報のごとく, Beeseyらの方法⁶⁾により定量した。

3) カテプシン: Ansonの方法⁷⁾により, 酸変性ヘモグロビンを基質として, 遊離したチロジンを610 m μ で比色定量した。緩衝液は酢酸緩衝液(pH3.0)を用いた。

対照実験には酵素液と基質液を別々に37°Cで30分 incubate し, 基質液に5%冷トリクロル酢酸を加えた後, 酵素液を加え, 冷却して30分放置し, ついで, 10,000g, 20分遠心して, その上清を被検液として用いた。

上記のすべての酵素活性は4回の実験の平均値を取めた。

結 果

I 光顕的及び電顕的所見

1. CCC肉芽腫

光顕的所見: CCC肉芽腫の構成はカラギニン肉芽腫と本質的な差異はみられない。注射後3日目には, CCCの間に多核球と単核細胞の浸潤が認められる。CCCはエオジンに淡染する等質性物質として認められ, メタクロマジーを示す。7日目には多核球の浸潤は減少し, 組織球の増殖が顕著となり, 肉芽腫を形成する。組織球内にはメタクロマジーを呈する多数の食胞が認められる。14日目には肉芽腫の中央は凝集状のCCCと変性細胞から成り, 断片状のコラーゲン線維がみられる。その外側は明瞭な境界をもって, 増殖し

た組織球の層で囲まれる。組織球内にはメタクロマジーを呈する食胞がみられる。細胞間のメタクロマジー物質は減少する。24日目には肉芽腫の構造は同様であるが, 細胞の減少と共に, 肉芽腫は縮小する。

電顕所見: CCC注射後3日目には単球, 多核球及び組織球がみられ, その間にCCCと同定される微細フィラメント状物質が多量に集積している。このCCC内にはしばしば長さ2,000~4,000Åの細線維状凝集物が認められる。組織球内にも同様な物質を満ちた食胞がみとめられる(図1)。

7日目には組織球の増殖は顕著である。細胞内にはCCCを含む多数の食胞がみられる。線維芽細胞の増殖はカラギニン肉芽腫に比べてはなだ低い。15日目には組織球の食胞は数と大きさを増加し, その内容が高電子密度の等質性物質に変わった空胞としてみられる(図2)。ときどき自家食胞が形成される。細胞間のCCCは減少し, 上述の細線維状凝集物が増加の傾向にある。ときどき膨化したコラーゲン線維に遭遇するが, カラギニン肉芽腫における特異な横紋パターンは認められない。

30日目では組織球の形態に関しては, 15日目のそれと大差はないが, 細胞外のCCCはかなり減少する。この時期で注目すべき所見は, 膨化した線維の間に, SLS線維が散在性に認められることである(図3)。しかしカラギニン肉芽腫にみられたFLSタイプの線維や第一報に述べた第3型線維には遭遇しなかった。

2. CMC肉芽腫

光顕的所見: CMC注射後3日目には皮下組織は水腫状で, びまん性に単核細胞と少数の多核球の浸潤がみられる。7日目には組織球が増加し, 肉芽腫が形成される。肉芽腫の中央部では凝集したCMCを取りまいて, 組織球が網状の配列を示す。肉芽腫の外側では組織球と線維芽細胞の増殖があり, 多数の好銀線維がみとめられる。CMCはPAS反応, メタクロマジーともに陰性である。組織球に貪食されたCMCは多数の空胞としてみとめられる。

14日目の肉芽腫は7日目のそれとほぼ同様な構造を示した。

電顕的所見: CMC注射後3日目では多数の特徴的な食胞をもつ組織球がみられる。食胞の内容は粗大な網状配列をとるフィラメントで占められ, 食胞は密集し, しばしば相互に融合する。細胞間には水腫状で, 食胞内容と同様なフィラメントが少数散在性にみとめられる。食胞内のフィラメントはその特有な形態から, 貪食されたCMCとみなされる。7-14日目では組織球の増加がみられ, 上記の食胞の数と大きさは増加し,

しばしば細胞質のほとんど全域が空胞で占められる(図4)。ときどき食胞内にはフィラメントとともに、ミエリン様構造体がみとめられる。細胞外のコラーゲン線維には構造的変化はみられなかった。

II. コラーゲナーゼ活性

CCC肉芽腫及びCMC肉芽腫のいずれのホモジネート中にも明らかなコラーゲナーゼ活性を認めることはできなかった。

対照として25 μ gのトリプシン(2回結晶, Sigma社)とincubateした場合より僅かに高い値を示したにすぎなかった(図5)。I 0.45で反応させた場合は、I 0.2におけるよりも約3倍の放射活性が出現した。この理由はまだ明らかではないが、対照としてトリプシンを用いた場合にも同様な現象が認められたので、イオン強度が高い場合にはコラーゲンゲルの形成が阻害され、上清中にゲル化しなかったコラーゲンが含ま

れていたことによる可能性がある。

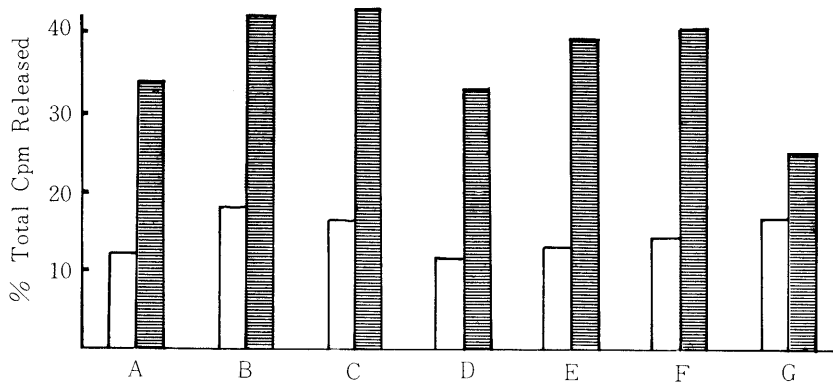
III. ライソゾーム酵素の活性

図6に示す如く、カテプシン及び酸性フォスファターゼ活性には両肉芽腫間に明らかな差は認められなかった。これに対して β -galactosidaseの比活性はCCC肉芽腫のホモジネートにおいてはCMC肉芽腫のその約2倍も高く、 β -glucosidaseについて、前者は後者の約1/5程度であった。CCC肉芽腫もCMC肉芽腫も細胞間物質に乏しく、又ホモジネートをモスリンでろ過することによって酵素タンパク以外のタンパク質はかなり除かれていると考えられるので、この比活性の差は十分有意なものであると思われる。

考 察

本研究においてCCC肉芽腫後期の細胞間にSLSが認められたことは重要な所見である。この事実はCCCか

図5 Radioactivity released from labelled Callagen Gels by Enzymes from CCC and CMC Granulomata.



A: Supernatant of the homogenate of CCC granuloma by centrifugation at 6,000g for 20min.

B: Pellet of the homogenate of CCC granuloma by the same method as in A.

C: Pellet of the homogenate of CCC granuloma by centrifugation at 6,000g for 20min. after isoelectric precipitation at pH 5.0.

D: Supernatant of the homogenate of CCC granuloma by the same method as in C.

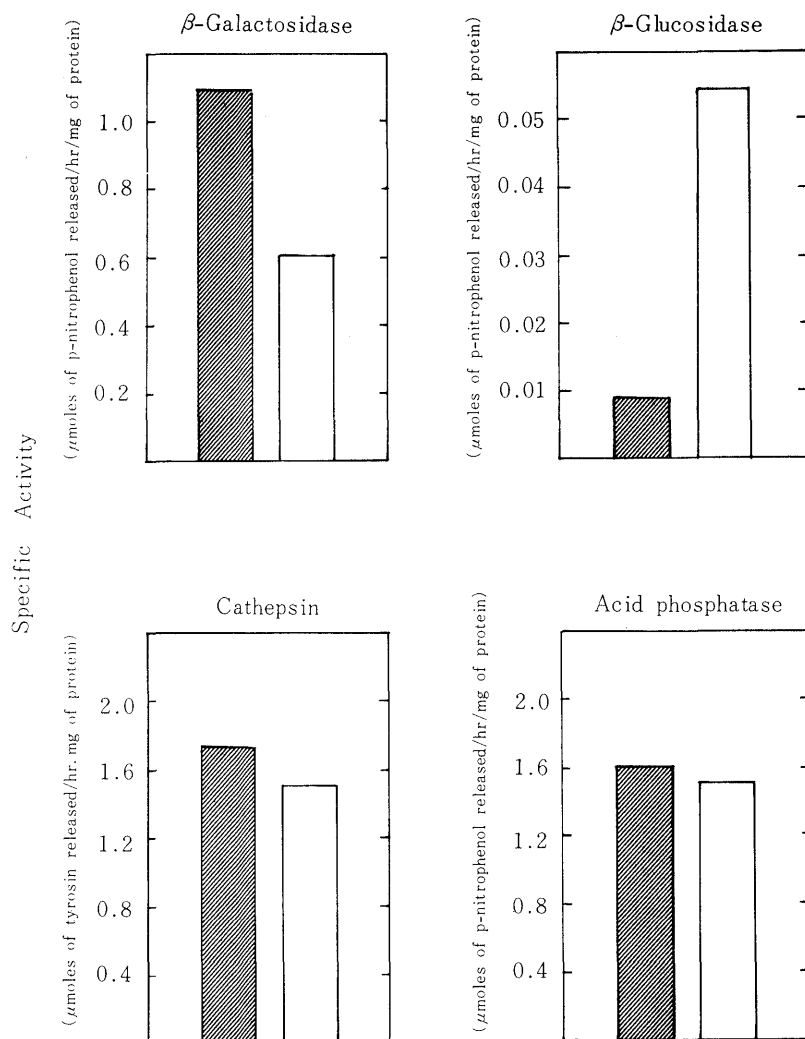
E: Supernatant of the homogenate of CMC granuloma by the same method as in A.

F: Pellet of the homogenata of CMC granuloma by the same method as in E.

G: trypsin (25 μ g)

Cross-hatched bars and white bars represent radioactivity at I 0.45 and I 0.2, respectively.

図6 Acid Hydrolase Activities in Homogenates of CCC and CMC Granulomata.



ら生体内でもSLSが形成されることを示し、カラギニン肉芽腫にみられたSLSはコラーゲン分解を表わしているものでなく、注射されたカラギニンとの相互作用の結果形成された線維であるという見解を支持する有力な証拠となる。

著者の実験範囲ではCCC肉芽腫にFLSは見い出されなかった。この理由は明らかではないが、*in vitro*でもCCCからFLSが形成される頻度は少なかったことから判断すると生体内の環境条件によるものかもしれない。実際、*in vitro*では酸性メジウムでのみCCCからSLSが形成されるので、生体内では細胞間の極

く限られた部分には生理的pHよりかなり低いpH領域の存在を仮定しなければならないであろう。おそらく、このような微妙な環境条件の変化が、CCCの凝集状態に影響を与えるものと考えられる。

CCCが組織球によって容易に貪食されることは明らかで、第一報に述べた組織球の食胞内フィラメントはその形態学的類似から大部分はCCCを表わしているものと推定される。つまり、カラギニンはコラーゲンと結合することによって、コラーゲンを異物化し、細胞内へ運びこむ役割をしているものと考えられるのである。

CCC肉芽腫とCMC肉芽腫に含まれるライソゾーム酵

素を比較すると次の3点が注目される。(1) β -galactosidase はCCC肉芽腫に増加するのに対し、(2) β -glucosidase はCMC肉芽腫に増加し、(3) カテプシン、酸性フォスファターゼ活性については両肉芽腫の間に有意な差が認められたことである。CCCもCMCも組織球に貪食されることは形態学的に明らかであるから、上述の成績は細胞は特定の貪食物質の消化に関連すると期待される酵素を選択的に多く合成する能力があることを強く暗示している。

Page-Thomas³⁾ はキチンをウサギの関節腔に注射すると、関節絨毛組織中の N-acetyl- β -D-glucosaminidase 及び β -galactosidase の活性が上昇することを報告し、消化されにくい物質が貪食された場合には、難消化ということが刺激となって貪食物質に特異的に作用する酵素が増加するものと説明している。

セルロースの誘導体であるCMCの主鎖を切断する酵素は哺乳類には存在せず β -glucosidase はCMC末端の glucosidase 結合を非常にゆっくり水解するのもかもしれない。同様にCCCにおいてもその主鎖を切断する酵素は哺乳類では報告がなく、 β -galactosidase によって末端の β -D-galactoside 結合が水解されるのかもしれない。そこで、CMCやCCCの細胞内消化は極めて徐々に行われ、Page-Thomas の指摘するようにこれらの水解酵素の進行的な上昇を招くという可能性がある。このように特定の水解酵素の増加をおこさせるためには、貪食物質が難消化性であることが必要と思われ、全く消化されない物質はたとえ細胞内にとりこまれてもライソゾーム酵素の増加は起こらないことが報告されている³⁾。

カラギニン肉芽腫の場合においても、注射されたカラギニン及び生体内コラーゲンと結合したCCCが組織球に貪食され、その消化酵素として β -galactosidase が合成されるが、この酵素が上述のようにカラギニンの末端部の結合を非常にゆっくりとしか水解せず、酵素合成に対する刺激が持続し、多量の β -galactosidase が産生されるのではないかと考えられる。

過剰に産生された β -galactosidase の運命については本研究ではまだ明らかにされていないが、培養細胞のライソゾーム酵素がメジウム中に分泌されるという報告から¹⁰⁾ 類推すると、 β -galactosidase の少なくとも一部は細胞外に分泌される可能性は十分あると思われる。もしそうであれば分泌された β -galactosidase によって、細胞外の糖タンパクやムコ多糖-タンパク複合体が水解され、その結果、コラーゲン重合やコラーゲン線維の安定性が障害されることは容易に考えられることである。このような障害をうけたコ

ラーゲンは他の非特異的プロテアーゼの作用をうけやすくなるであろうし、また細胞によって貪食されることも可能であると思われる。

カラギニン肉芽腫ホモジネート中にはコラーゲンを分解する因子の存在が示唆されたが、CCC肉芽腫中にはコラーゲナーゼ活性は検出されなかった。この理由は明らかではないが、カラギニン肉芽腫にはCCC肉芽腫より多数の多核球が浸潤しているので、カラギニン肉芽腫ホモジネートによるコラーゲンの分解は多核球由来のコラーゲナーゼ²⁾ が作用しているのかもしれない。また、CCC肉芽腫ホモジネートにもある程度のコラーゲナーゼ活性はあるが、血清由来のコラーゲナーゼ阻抑物質の作用が強いため、著者の測定方法では検出できなかったのかもしれない。

結 論

前報で報告したカラギニン-コラーゲン複合体をラット皮下に注射すると組織球を主要構成細胞とする肉芽腫が形成され、細胞間にSLS線維が見い出された。この肉芽腫のホモジネートからはコラーゲナーゼ活性は検出できなかったが、 β -galactosidase の特異的増加が認められた。

一方カルボキシメチルセルロースの注射によって作られたラット皮下肉芽腫のホモジネートの中に β -glucosidase 活性の上昇が証明された。カテプシンと酸性フォスファターゼ活性は、これら2種の肉芽腫の間に有意な差は認められなかった。

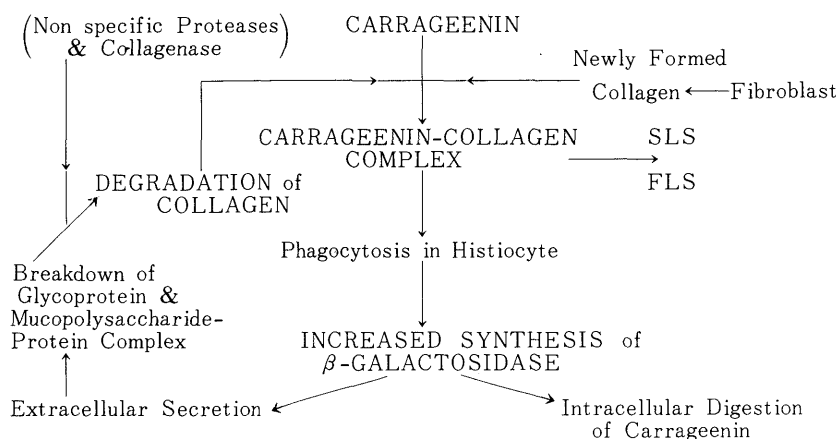
これらの成績から消化されにくい物質が貪食されると、その物質の消化に関連すると期待される酸性水解酵素の産生が選択的に増加することが示唆される。

カラギニン肉芽腫においては、注射されたカラギニンが生体で合成されたコラーゲン分子と結合し複合体をつくるのが最も特徴的現象であると思われる。コラーゲンはカラギニンと複合体をつくることによって異物化され、組織球に貪食され細胞内消化をうける。一方複合体に含まれるカラギニンは組織球における β -galactosidase の合成を増強させる。過剰に産生された β -galactosidase は、おそらく細胞外に分泌され、糖タンパクやムコ多糖-タンパク複合体を分解することによって、間接的にコラーゲンの分解と吸収に関与するものと推定される。

本研究の結果を総合すると、カラギニン肉芽腫におけるコラーゲン分解はおよそ次の機序によって行なわれるものと推定される(図7)。

1. カラギニン注射により、まず白血球の浸潤を伴う炎症反応がおこるが、すぐに線維芽細胞と組織球

図7 POSSIBLE MECHANISM of COLLAGEN BREAKDOWN
in CARRAGEENIN GRANULOMA.



の増殖が始まる。

2. 注射されたカラゲニン線維芽細胞から分泌されたコラーゲン分子と結合し、複合体をつくる。

3. 新生コラーゲンはカラゲニンと複合体をつくることにより異物化され組織球に貪食される。新生コラーゲンの大部分はこうにして、組織球内に運びこまれてそこで消化される。

複合体の一部は細胞間質の狭い部分におけるpHやイオン強度の変化により、SLS又はFLS線維を形成する。

4. 複合体を貪食した組織球の中では、カラゲニン(sulfated polygalactose)の消化に必要なβ-galactosidaseの合成が特異的に促進される。

5. 過剰に産生されたβ-galactosidaseの一部は細胞外に分泌され、肉芽腫の礎質を構成する糖タンパクやムコ多糖-タンパク複合体を分解する。

6. その結果、一方では新生コラーゲンの重合が、阻止され、他方では、既存線維の安定性が失われ、コラーゲンの解重合がおこる。

7. 低重合又は解重合したコラーゲンは組織の低いpH領域で変性し易く又非特異的プロテアーゼの作用を受け易くなる。コラーゲン分解に対してはコラーゲナーゼの参加も否定されない。変性したコラーゲンの一部は組織球によって貪食され細胞内で消化される。

8. 細胞外で分解されたコラーゲンは、再びカラゲニンと結合して複合体を形成し、コラーゲン分解の過程が進行する。

謝辞：本研究に対し、終始暖かい御指導を賜りました恩師梶川欽一郎教授に心からの感謝の念を捧げます。また研究遂行に際し多大の便宜を与えて下さいました、がん研究所免疫生物部西東利男教授、コラーゲンのアミノ酸自動分析をお願いした小児科学教室小泉晶一先生、SLSのデンストメトリーをお願いした第一解剖学教室斎輪真澄先生及び教室員、電子顕微鏡技術員の方々に深謝致します。

文 献

- 1) Kang, A. H., Nagai, Y., Piez, K. A. & Gross, J. : Biochemistry, 5, 509 (1966).
- 2) Lazarus, G. S., Daniels, J. R., Brown, R. S., Bladen, H. A. & Fullmer, H. M. : J. Clin. Invest., 47, 2622 (1968).
- 3) Bray, G. A. : Anal. Biochem., 1, 276 (1960).
- 4) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. : J. Biol. Chem., 193, 265 (1951).
- 5) Beck, C. & Tappel, A. L. : Biochim. Biophys. Acta, 151, 159 (1968).
- 6) Bessey, O. A. & Lowry, O. H. & Brock, M. J. : J. Biol. Chem., 164, 321 (1946).
- 7) Anson, M. L. : J. Gen. Physiol., 20, 565 (1936).
- 8) Page-Thomas, D. P. : Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix, ed. by Balaz, E. A., vol. 3, p. 1711, London & New York, Academic Press, 1970.

9) Axline, S. G. & Cohn, Z. A. : J. Exptl. Med, 131, 1239 (1970).

10) Fell, H. B. & Dingle, J. T. : Biochem. J., 87, 403 (1963).

図 の 説 明

図1. CCC肉芽腫3日目. 細胞外のCCCは細線維状凝集物を含むフィラメントの集積としてみとめら

れる. H: 組織球. $\times 30,000$

図2. CCC肉芽腫15日目. 組織球の食胞内フィラメント状物質(貪食されたCCC). $\times 24,000$

図3. CCC肉芽腫30日目. 膨化したコラーゲン線維間質に見られたSLS線維(長さは約 $2,900\text{\AA}$). ウラニール, 鉛染色. $\times 100,000$

図4. CMC肉芽腫7日目. 組織球の粗大なフィラメント状物質を含む多数の食胞. $\times 20,000$

A b s t r a c t

Electron microscopic observation revealed that SLS was present in the extracellular space of the granuloma induced by carrageenin-collagen complex in the rat's subcutaneous tissue. Collagenase activity was not detected in homogenates of the granuloma.

Comparative studies were made on lysosomal hydrolase activity in the carrageenin-collagen complex granuloma and in the granuloma induced by carboxyl-methyl cellulose. The former granuloma showed increased β -galactosidase activity, whereas the latter increased β -glucosidase activity. Concerning cathepsin and acid phosphatase activity there was no significant difference between these two granulomata. Electronmicroscopically both the granulomata consisted largely of histiocytes which had numerous phagocytic vacuoles containing the substances injected. These findings suggested that histiocytes reacted to the substrate resistant to available lysosomal hydrolases by increased specific enzyme synthesis.

To summarize the foregoing data the following hypothesis is proposed to explain the mechanism by which collagen is broken down in carrageenin granuloma :

Carrageenin stimulates fibroblast proliferation. Collagen secreted from fibroblasts is coupled with carrageenin to form the complex which is readily taken up into histiocytes and sustains intracellular digestion. Histiocytes, on the other hand, are required to synthesize a large quantity of β -galactosidase for digestion of the carrageenin moiety of the complex ingested. An excess of synthesized β -galactosidase, at least in part, may be released outside the cells. In extracellular space β -galactosidase may be significant in collagen degradation by attacking glycoprotein and mucopoly saccharide-protein complex which are considered to play a role in the maintenance of stability of collagen fibers.

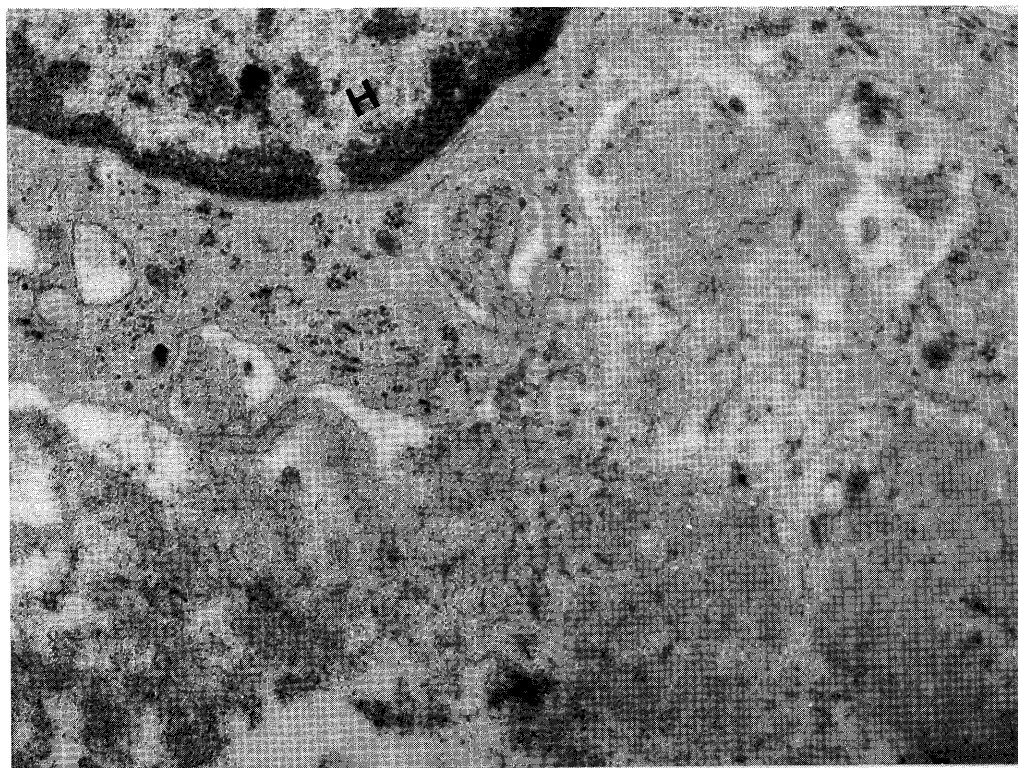


図 1

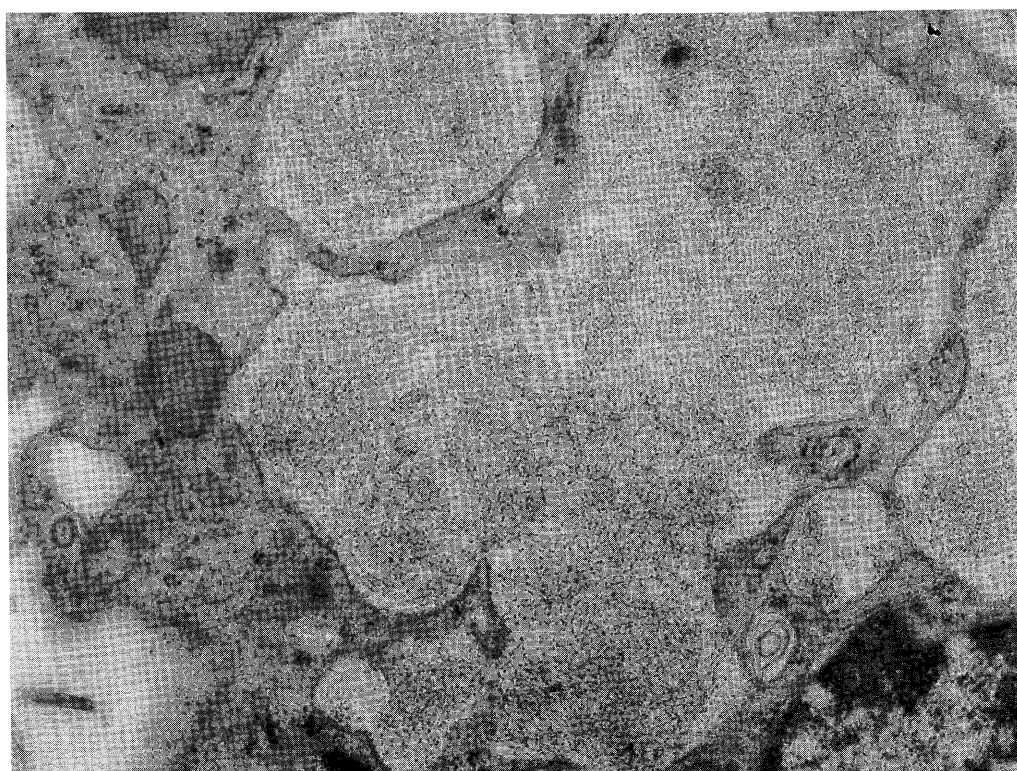


図 2

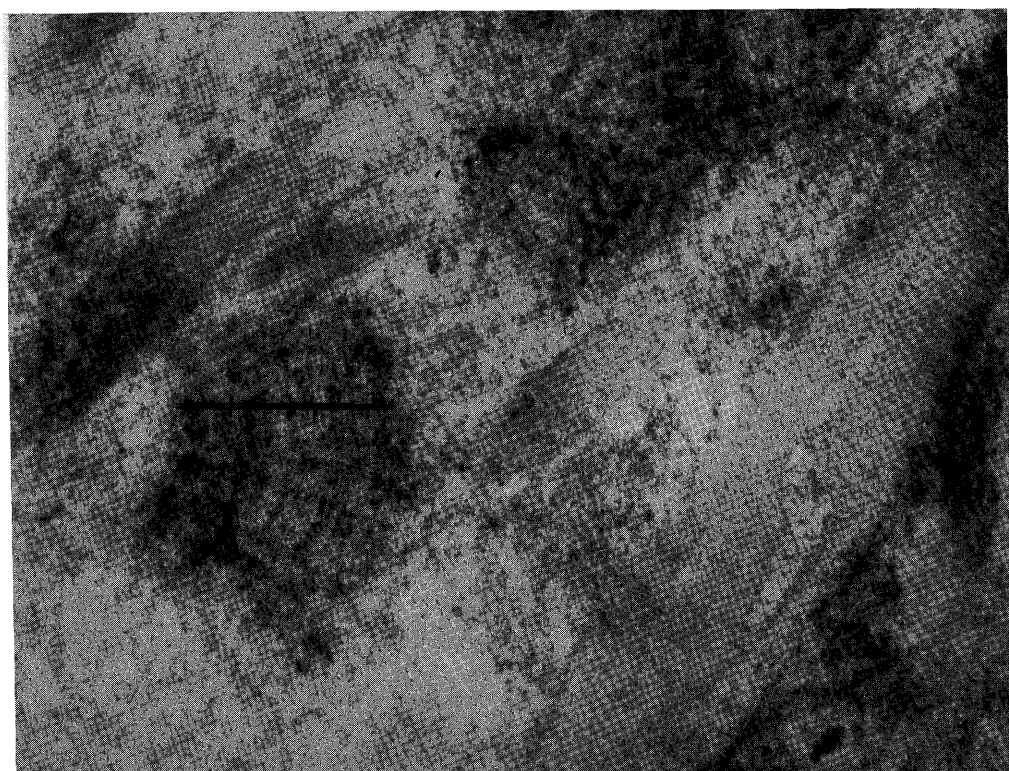


図 3

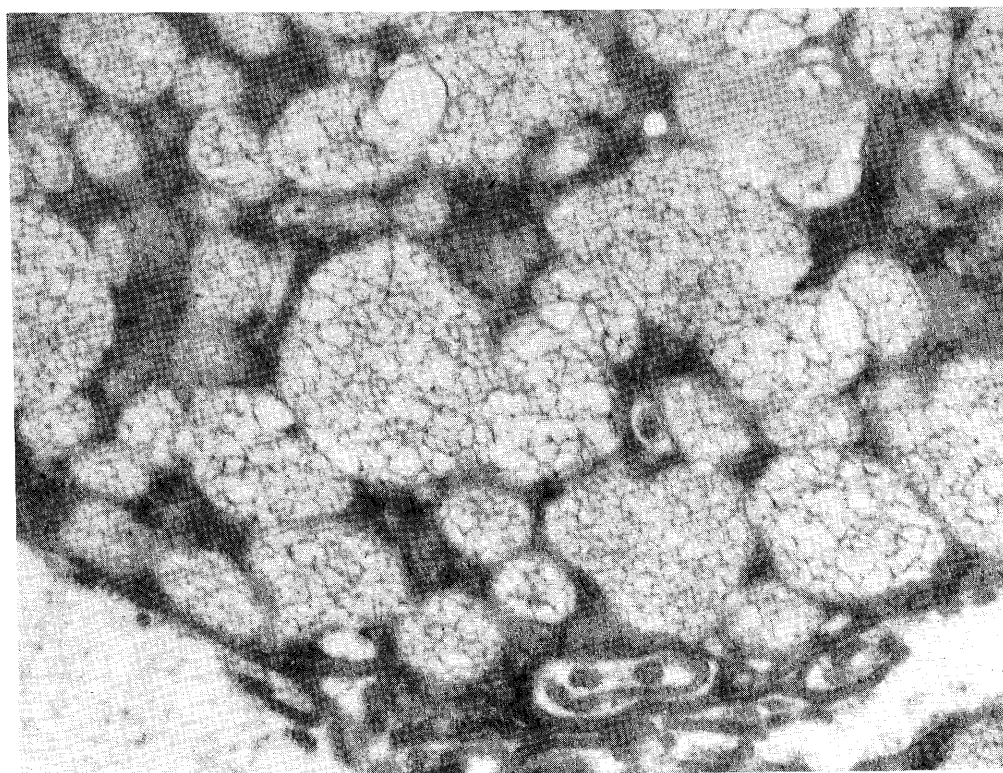


図 4