ヒト好中球エラスターゼの精製，性質および炎症組織における局在

メタデータ	言語: Japanese
	出版者:
	公開日: 2017-10-04
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 渡辺, 秀人
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8083

ヒト好中球エラスターゼの精製，性質および炎症組織における局在

金沢大学医学部病理学第一講座（主任：中西功夫教授）
渡　辺　秀　人

（平成1年1月14日受付）

炎症における組織破壊に果たす好中球エラスターゼの役割を検討するために本酵素の精製と基質特異性の検討を行った．さらに精製したヒト好中球エラスターゼに対する単クローン抗体を作製し，炎症組織における本酵素の局在を免疫組織化学的に検索した．新鮮ヒト末梢血2.61（好中球4.9×10^9個）からヘパリンアミノセルロファイン，アプロチニンアガロース，カルボキシメチルセルロースの3本のカラムを用いることによって好中球エラスターゼは分子量約25000の2種のアイソザイム（E1, E2と命名，E1＝100μg；E2＝210μg）として精製された．このエラスターゼは不溶性エラスチン分解能のみならずI型コラーゲンの架橋分解能，III型コラーゲンの分子鎖内の切断能，IV型コラーゲン，ラミニンおよびフィブロネクチンに対する限定的分解能，さらにプロテオグリカン分解能を有していた．このことは炎症の場において好中球エラスターゼがエラスチン，間質型コラーゲンなどの線維成分，IV型コラーゲンやラミニンなどの基底膜成分，プロテオグリカンなどの礎質を分解する可能性を示唆している．精製したエラスターゼに対する単クローン抗体はサブクラス IgG_1 で本抗体のエピトープは活性に関与しない部位であることが示唆された．この抗体を用いて免疫組織化学的にエラスターゼの局在を検討したところ，気管支肺炎，結節性多発動脈炎および慢性関節リウマチにおいて炎症組織に浸潤している好中球の胞体および細胞外の間質にエラスターゼが認められた．また気管支肺炎，結節性多発動脈炎ではエラスターゼの分布に一致して弾性線維の崩壊がみられ，炎症局所において本酵素が実際に酵素活性を発揮し組織破壊に重要な役割を果たしていることが示唆された．抗ヒト好中球エラスターゼ抗体を用いた免疫組織化学的検索は好中球の関与する各種疾患の病態解析に役立つものと考えられた．

Key words neutrophil elastase, inflammation, matrix degradation, monoclonal antibody, immunohistochemistry

炎症は防衛的，修復的な局所の組織反応であり，組織障害性因子を除去し損傷部を修復に導く一連の反応過程として理解することができる．この炎症を特徴付ける基本的現象の一つは血液細胞の血管外への浸出であり，急性炎症で主役をなすのは白血球，とくに好中球である．好中球は貪食・殺菌作用や生物活性因子放出らの生体防御的機能を遂行するが，一方ではこの好中球が放出するタンパク分解酵素によって組織が破壊される[1)2)]．組織破壊には血漿ならびに細胞由来の細胞間マトリックス分解酵素が大きな役割を演ずるものと考えられるが，好中球の分泌する細胞間マトリックス分解酵素としては，コラゲナーゼ[3)~10)]，ゼラチナーゼ[3)~6)]，エラスターゼ[11)~13)]カテプシンG[14)15)]らをあげることができる．このうち好中球由来のエラスターゼはエラスチンのほかI型[16)]，II型[16)17)]，III型[19)20)]，IV型コラーゲン[21)]，フィブロネクチン[22)]，プロテオグリカン[23)23)]ら幅広い基質分解能を有し，炎症性病変，特に炎症初期における組織破壊に重要な役割を果すものと考え

Abbreviations: ABC, avidin biotin complex; α_1-PI, α_1-proteinase inhibitor; BSA, bovine serum albumin; CMC, carboxymethyl-cellulose; DFP, diisopropyl fluorophosphate; EDTA, ethylenediamine tetraacetic acid; EHS, Engelbreth-Horm-Swarn; ELISA

られる．

好中球エラスターゼは好中球のアズール顆粒に存在し[25]，これまでに Baugh ら[26]，Heck ら[27] および Barret ら[12]によって精製されている．しかし，その精製方法に関しては，血球の処理方法やカラム条件に違いがあり，また，それぞれの方法によってエラスターゼの精製率に差が見られるので，精製方法が完全に確立されているとは言い難い．また，好中球エラスターゼに対する抗体の作製および同抗体を用いてエラスターゼの局在を免疫組織化学的に検討した研究が散見されるようになった[28)~32]が，同酵素が実際生体内の病変部において細胞間マトリックス成分を分解し組織の破壊にどれ程関与しているかを明確に示した研究はほとんどみられない．

本研究において著者は好中球エラスターゼの精製方法および精製したエラスターゼの基質特異性を検討した．さらに，同酵素に対する単クローン抗体を作製し，炎症巣における好中球エラスターゼの局在を免疫組織化学的に検索し，炎症性病変における同酵素の役割について考察を加えた．

材料および方法

I．実験方法

デキストラン，デキストロース，ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) は和光純薬 (大阪) より，ザイモサンA，サイトカラシンB，エチレンジアミン四酢酸 (ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA). 1, 10-phenanthroline, ダイズトリプシンインヒビター (soybean trypsin inhibitor SBTI)，ジイソプロピルフルオロ燐酸 (diisopropyl fluorophosphate, DFP)，N-エチルマレイミド (N-ethylmaleimide, NEM)，ペプスタチンAは SIGMA 社 (St. Louis, USA) より購入した．アプロチニンアガロースゲルはフナコシ社 (東京) より，カルボキシメチルセルロース (carboxymethyl-cellulose, CMC) ゲルは Whatman Ltd, (Springfield Mill, England) より，Balb/c マウスは Charles River Japan (東京) よりそれぞれ購入した．ペニシリン-ストレプトマイシン溶液，ヒポキサンチン-アミノプテリン-チミジン (hypoxanthine-aminopterin-thymidine, HAT) 溶液 (×100)，L-グルタミン酸および Nonessential amino acids 溶液は GIBCO 社 (New York, USA) より，Mouse monoclonal typing kit は ICN immunological 社 (Irvine, USA) よりそれぞれ入手した．o-フェニレンジアミンは半井化学 (京都)，Pyroglutamylprolylvalylparanitroanilide (<Glu-Pro-Val-pNA) は第一化学薬品工業 (東京)，正常マウス IgG は Jackson Immuno Research 社 (Baltimore, USA)，ABC キットは VECTOR 社 (Burlingame, USA) のものをそれぞれ使用した．

ヘパリンアミノセルロファインゲル，トリチウム (^{3}H) 標識ウシ不溶性エラスチン，ヒトI型，II型，III型，IV型，V型コラーゲン，ラミニン，細胞性フィブロネクチン，プロテオデルマタン硫酸は，東京医科歯科大学難治疾患研究所異常代謝部門，永井裕教授より恵与された．Engelbreth-Holm-Swarn (EHS) 肉腫由来IV型コラーゲンは金沢大学医療技術短期大学部，岡田保典助教授より，血漿フィブロネクチンは教室の河原栄講師より恵与うけた．

II．酵素活性の測定

1．エラスターゼ活性の測定

エラスターゼ精製過程におけるエラスターゼ活性の測定は合成基質を用いて検討した．<Glu-Pro-Val-pNA 1mM/0.05M Tris-HCl pH 7.6/0.15M NaCl/10%ジメチルスルホキシド (DMSO) 溶液 50μl に試料を添加し，37°Cにて反応させ波長 405nm の吸光度で活性を測定した．反応には96穴マイクロタイタープレートを用いた．この方法で37°CにてΔA_{405nm}=1.0/min を与える酵素活性を1単位 (Unit) と定義した．

2．ゼラチナーゼ活性の測定

エラスターゼによるゼラチン分解活性は Sunada ら[33]の方法を一部改変した．0.5mg/ml FITC 標識ゼラチン (熱変性ウシI型コラゲーン) /0.05M Tris-HCl, pH 7.6/0.2M NaCl/5mM $CaCl_2$ 100μl と試料溶液100μl とを遮光チューブ内で35°Cにて反応させ，5.3% 2M Tris-HCl, pH 9.5/94.7%エタノール溶液 750μl を加え，激振後遠心 (600×g, 20分) し，上清を蛍光分光光度計650－60型 (日立，東京) を用いて励起波長 495nm, 蛍光波長 520nm にて測定した．

III．ヒト好中球顆粒蛋白の調製

健常人のボランティアより採取した末梢血2.61から，Chodirker ら[34]の方法に従い，3%デキストラン－3%デキストロースによる赤血球沈降除去，リン酸緩衝 (0.02M) 生理食塩水 (phosphate-buffered

enzyme-linked immunosorbent assay; EVG, elastica van Gieson: <Glu-Pro-Val-pNA, pyroglutamylprolylvalylparanitroanilide; HAT, hypoxanthine-aminopterin-thymidine; H, E., hematoxylin eosine; HEPES, N-2-hydroxyethyl-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid;

saline, PBS) による洗浄を繰り返して白血球を採取した．0.83% NH_4Cl 溶液を用いて混在する赤血球を溶血させ，一回洗浄後，0.01Mジエチルピペラジン－N'-2-エタンスルホン酸 (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid, HEPES), pH 7.2/0.15 M NaCl 溶液に白血球を懸濁した．すでに白血球以外の血球には，<Glu-Pro-Val-pNA 分解活性が存在しないことを確認しているので白血球画分からの好中球の分離は行わなかった．

好中球の脱顆粒は Absolom ら[35]の方法に従っておこなった．0.02% BSA/0.01M HEPES, pH7.4/0.15 M NaCl 溶液 10ml 中に2.0×10^8個の好中球が含まれるように白血球を懸濁し，直径 10cm のプラスチックシャーレ内で，オプソニン化ザイモサンA 10mg, サイトカラシンB50μg の存在下で，37°Cにて45分間脱顆粒させた．

なお，ザイモサンAのオプソニン化は以下の方法で行った．ザイモサンA 250mg を PBS にて 2 回洗浄し，血清 15ml を37°Cにて20分間作用させた．その後 PBS にて 1 回，0.01M HEPES, pH 7.2/0.15M NaCl 溶液にて 1 回洗浄後，同溶液 16ml に懸濁した．プラスチックシャーレ内の白血球，オプソニン化ザイモサンおよび顆粒をラバーポリスマンを用いてシャーレから採取した．位相差顕微鏡を用いてシャーレからの顆粒の回収を確認した．回収液を遠心 (600×g, 10分) し，上清の顆粒画分を 2 回抽出した．顆粒を超音波破砕し，超遠心 (20,000×g, 30分) を行って顆粒タンパクを 2 回抽出した．この顆粒タンパクをエラスターゼの精製の材料とした．

IV．ヒト好中球エラスターゼの精製

1．ヘパリンアミノセルロファインカラムクロマト

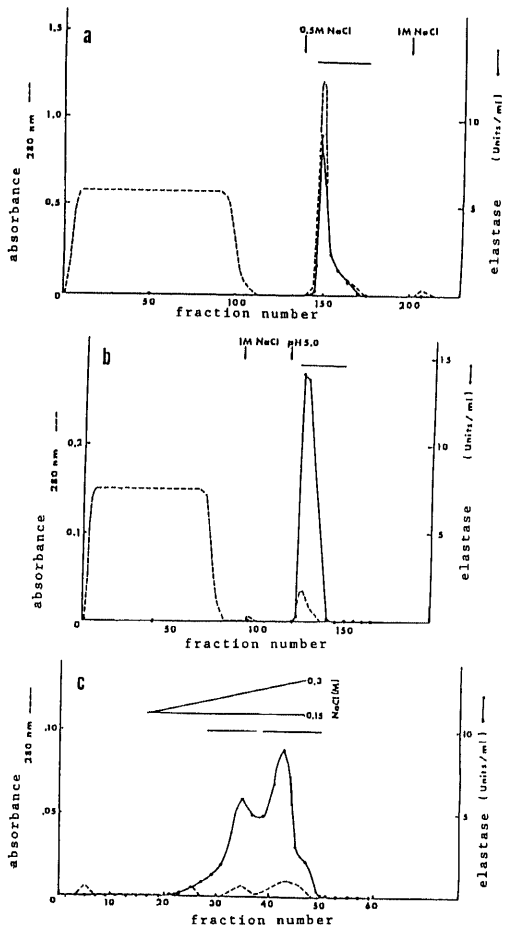

Fig. 1. Patterns of column chromatography (a) Heparin-aminocellulofine chromatography. The granular proteins were dialysed against 0.05 M Tris-HCl pH 7.6/0.05 M NaCl/5 mM $CaCl_2$ and applied to a column of heparin-aminocellulofine chromatography (2.5×3cm) equilibrated with the same buffer. The distribution of A_{280} (…) and elastase activity (●) are shown. (b) Aprotinin-agarose chromatography. The fractions with elastase activity were combined and charged on a column of aprotinin-agarose (1.5×5cm) equilibrated with 0.05 M Tris-HCl pH 7.6/0.5M NaCl. The elastase activity (●) was eluted with 0.05 M sodium acetate buffer pH 5.0/1 M NaCl. Fractions were collected in tubes containing 2 M Tris-HCl pH 8.0, to return the pH immediately to the neutral range. The distribution of A_{280} (…), and elastase activity (●) are shown. The fractions indicated were combined for further purification. (c) CMC chromatography. The pool from aprotinin-agarose column was concentrated by Amicon membrane (YM-10) to 10 ml, dialysed against 0.05 M sodium acetate pH 5.5/0.15 M NaCl, and charged on a column of CMC (1.5×5cm) equilibrated with the same buffer. The absorbed elastase activity (●) was eluted by the salt gradient from 0.15 M to 0.3 M NaCl in the same pH. The distribution of A_{280}(…), and elastase activity (●) are shown.

NEM, N-ethylmaleimide; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; PBS, phosphate-buffered saline; PMSF, phenylmethanesulfonyl fluoride; PN, polyarteritis nodosa; RA, rheumatoid arthritis; SBTI, soybean trypsin inhibitor; SDS, sodium dodecylsulfate

グラフィ (図 1a)

好中球顆粒タンパク画分を0.05M Tris-HCl, pH 7.6/0.05M NaCl/5mM $CaCl_2$ 緩衝液に透析し，析出した不溶性画分を遠心 (5,000×g, 30分) によって除去し，同液で平衡化したヘパリンアミノセルロファインカラム (2.5×3cm) に供した．カラムを通った溶液は3ml ずつフラクションチューブに分取した．エラスターゼ活性は素通り画分には認められず，0.5M NaCl の塩濃度で溶出された．

2．アプロチニンアガロースカラムクロマトグラフィ (図 1b)

ヘパリンカラムから溶出されたエラスターゼ画分を，0.05M Tris-HCl, pH 7.6/0.5M NaCl 緩衝液にて平衡化したアプロチニンアガロースカラム (1.5×5cm) に供した．素通り画分にはエラスターゼ活性は認められなかった．吸着されたエラスターゼ画分を0.05M酢酸ナトリウム pH 5.0/1.0M NaCl 緩衝液にて溶出した．溶出液を3ml ずつフラクションチューブに分取したが，溶出液が迅速に中性となるように各々のフラクションチューブに 2M Tris-HCl, pH 8.0, 100μl をあらかじめ加えておいた．

3．CMC カラムクロマトグラフィ (図 1c)

エラスターゼ画分を集め，0.05M酢酸ナトリウム pH 5.5/0.15M NaCl 緩衝液にて透析し，同緩衝液で平衡化した CMC カラム (1.5×5cm) にこれを供した．塩濃度0.15M NaCl から0.3M NaCl までの濃度勾配にてエラスターゼを溶出した．溶出されたエラスターゼの活性は二峰性を示した．No.28 から No.37 までと No.38 から No.50 までのフラクションを各々集め，sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (10-15% gradient gel) を用いて検討したところ，各々単一のバンドとして精製されたことが確認されたので，先に溶出されたエラスターゼ画分を E1, 後に溶出されたエラスターゼ画分を E2 と名付けた．

図 2 は，各精製段階のタンパクを SDS-PAGE (10-15% gradient gel) 後，銀染色したものである．E1 は分子量役25,000の領域に，E2 は E1 よりやや低分子量領域にそれぞれ単一のバンドとして認められた．

V．プロティナーゼインヒビターを用いた精製エラスターゼの阻害試験

精製したエラスターゼの触媒残基に基づく分類を行う目的で，様々なプロティナーゼインヒビターのエラスターゼ活性阻害能を検討した．

金属プロティナーゼのインヒビターとしては，EDTA 50mM，および 1, 10-phenanthroline 5mM を用いた．セリンプロティナーゼのインヒビターとしては，phenylmethane-sulfonyl fluoride (PMSF) 10, 1.0mM, DFP 10, 1.0mM 及び SBTI 1mM を用いた．チオールプロティナーゼおよび酸性プロティナーゼのインヒビターとしては各々 NEM 10mM およびペプスタチンA 50mM を使用した．エラスターゼとしては，E1, E2 との混合液を用いた．各々のインヒビターとエラスターゼとを等量混合し，25°Cにて30分間反応させたものを試料として <Glu-Pro-Val-pNA を用いてアッセイした．

VI．ヒト好中球エラスターゼの in vitro における基質特異性

精製したエラスターゼ E1 あるいは E2 を用いて本酵素のエラスチン及び他の細胞間マトリックス成分由来の基質について分解能を検討した．

1．エラスチン

Banda ら[36]の方法に従って精製エラスターゼのエラスチン分解活性を検討した．^{3}-H で標識したウシ項靱帯由来の不溶性エラスチンを基質として用いた．同基質200μg (129,000dpm) に E2, 60ng を添加し，0.05M Tris-HCl, pH 7.6/0.15M NaCl 20μl 中で37°Cにて反応させた．反応後，遠心 (300×g, 5 分) し，上清を採

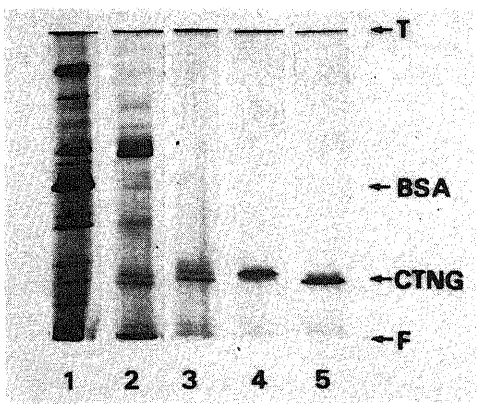

Fig. 2. Gel slab electrophoresis of human leukocyte granule extract fractions at each stage of the purification of human granulocyte elastase (s). The silver-stained patterns are shown. Lane 1, granular proteins ; 2, elastase fraction from heparin-aminocellulofine column ; 3, elastase fraction from aprotinin-agarose column ; 4, elastase fractions (28－37) from CMC column ; 5, elastase fractions (38－50) from CMC column. T, top ; F, front ; BSA, bovine serum albumin (67K) ; CTNG, chymotrypsinogen (25K).

取して放射活性を測定した．

2．コラゲーンおよびその他の細胞間マトリックス成分

ヒトI型，II型，III型，及びV型コラーゲンについては，各コラーゲン 20μg とエラスターゼ (E2, 100ng) とを0.05M Tris-HCl, pH 7.6/0.15M NaCl 20μl 中で25°Cにて20時間反応させた．IV型コラーゲンについては，EHS 肉腫由来およびヒト胎盤由来のものを各々10μg と E2 10ng とを0.05M Tris-HCl, pH 7.6/0.15M NaCl 溶液20μl 中で25°Cにて反応させた．ラミニンについては，EHS 肉腫由来ラミニン 20μg と E1 あるいは E2 100ng とを0.05M Tris-HCl, pH 7.6/0.15M NaCl 20μl 中で37°Cにて反応させた．フィブロネクチンについては血漿あるいは細胞性フィブロネクチン24μg と E2 30ng とを0.05M Tris-HCl, pH 7.6/0.15M NaCl 10μl 中で37°Cにて反応させた．プロテオデルマタン硫酸については高分子量画分と低分子量画分について，各々20μg と E2 100ng とを0.05M Tris-HCl, pH 7.6/0.15M NaCl 10μl 中で37°Cにて反応させた．

インキュベーション後，PMSF 100mM 1μl を添加して反応を止め，各々の反応液を還元あるいは非還元条件下で Weber ら[37]の方法に従って SDS-ポリアクリルアミドケル電気泳動 (SDS-PAGE) に供し，バンドのパターンを検討した．

VII．抗ヒト好中球エラスターゼ単クローン抗体の作製および同抗体の性質の検討

1．単クローン抗体の作製[38][39]

抗原としては精製した E1, E2 混合液を使用した．PBS 50μl 中のエラスターゼ20μg と完全フロイントアジュバンド50μl からエマルジョンを作製し，一匹当たり20μg エラスターゼ (E1+E2) を7週齢オス Balb/c マウス尾根部皮下に免疫した．14日後エラスターゼ (E1+E2) 20μl /PBS 溶液100μl 尾静脈に注射してブースターを行った．その3日後，脾細胞を採取し，1.2×10^8個の脾細胞に対し4.0×10^7個の sp2/0骨髄腫細胞を45%ポリエチレングリコール下で融合させ，16時間後，HAT 溶液を用いて融合細胞を選択した．2週間後，enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法を用いて抗ヒト好中球エラスターゼ抗体を産生しているハイブリドーマ細胞をスクリーニングした．選択したハイブリドーマ株をクローニングした後増殖させ，再び (ELISA) 法を用いて抗エラスターゼ産生株を選び再びクローニングを行った．最終的に1クローンを選び Balb/c 腹腔内で増殖させ，腹水から Affigel Protein A カラム (日本バイオラッド ラボラトリーズ，東京) を用いて抗体を精製した．精製抗体はウェスタンブロッティング法[40]を用いて抗原との対応を検討した．

2．精製抗体の性質の検討

精製した抗体の抗体価は ELISA 法によって，サブクラスはマウスモノクローナルタイピングキットを用いて検討した．

精製抗体の酵素活性阻害能については同酵素のゼラチン分解活性阻害能をもって検討した．エラスターゼ E2 と，100倍から204800倍までの各希釈倍率の精製抗体とを0.02%マウス IgG/0.05M Tris-HCl, pH7.6/0.15M NaCl 溶液中で4°Cにて一晩，反応させたものを試料としてゼラチナーゼ活性の測定を行った．

VIII．抗ヒト好中球エラスターゼ単クローン抗体を用いた免疫組織学的検討

1．対象

気管支肺炎2例の肺組織 (剖検例)，結節性多発動脈炎 (polyarteritis nodosa, PN) の小腸および皮膚各1例，2例の慢性関節リウマチ (活動期) の増殖滑膜および関節腔より採取した浸出物 (以上手術材料) 計6例について組織学的ならびに免疫組織化学的に検索した．組織学的には，10%中性緩衝ホルマリン固定後，パラフィン切片を作製し，ヘマトキシリン・エオジン (hematoxylin eosin, H.E) 染色，アザン染色，エラスチカ・ワンギーソン (elastica van Gieson, EVG) 染色および鍍銀染色を施した．

2．免疫組織学的検索

上記症例について酵素抗体法間接法にてエラスターゼの局在を検索した．各組織切片を脱パラフィンし，1% H_2O_2/99%メタノールを室温にて30分間浸漬させることによって内因性ペルオキシダーゼ活性をブロックした．PBS にて洗浄後，非特異的反応を抑制する目的で3% BSA/PBS を室温にて30分間作用させた．引き続き，作製抗エラスターゼ抗体 (100倍希釈 PBS) を4°Cにて一晩反応させた．つぎに冷 PBS にて10分間，3回洗浄したのち，ビオチン化ウマ抗マウス IgG 抗体を用いた ABC 法を施行した．陰性対照としては，抗エラスターゼ抗体の代わりに正常マウス IgG を反応させた．

気管支肺炎および結節性多発動脈炎の症例では弾性線維と好中球エラスターゼの局在を明瞭に提示する目的で免疫染色後，ワイゲルトの弾性線維染色を施した．

成　　績

I．ヒト好中球エラスターゼの精製

Table 1. Purification of human leukocyte elastase

Fraction step	Total protein (mg)	Total activity (Units)	Recocovery (%)	Specific activity (Units/mg)	Purification
Granular protein	202	906	100	4.5	1.0
Heparin-aminocellulofine	25	772	85	31	6.9
Aprotinin-agarose	0.75	419	46	560	124
CM-cellulose					
E1	0.10	92	10	920	204
E2	0.21	113	13	540	120

Table 2. Effect of inhibitors on purified elastase (E2)

Inhibitor	Concentration	Activity(%)
EDTA	50 mM	117
1,10-phenanthroline	5 mM	102
PMSF	10 mM	0
	1 mM	0
DFP	10 mM	0
	1 mM	0
SBTI	1 mM	0
N-ethylmaleimide	10 mM	80
Pepstatin A	50 mM	77

三本のカラムクロマトグラフィによる好中球エラスターゼの各精製段階のタンパク量，精製率，エラスターゼ活性および比活性は表1に示すとおりである．精製率は E1＝204 倍，E2＝120 倍で，比活性は E1＝920, E2＝540 単位/mg であった．末梢血2.6l を用いて，7×10^9個の好中球からタンパクとしての収量は E1＝0.10mg, E2＝0.21mg (分子吸光係数 A_{280nm}/1%＝9.84) であった．なお，合成基質 Benzoyltyrosylparanitroanilide および N-succinylalanylalanylprorylphenylalanylparanitroanilide (N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA) を用いてカテプシンGのアッセイを行ったが，カラムクロマトグラフィの全過程を通じてカテプシンG活性は検出されなかった．

表2は，各種プロティナーゼインヒビターの精製エラスターゼに対する活性阻害効果を示している．エラスターゼは，PMSF, DFP, SBTI によって完全に阻害されたが，EDTA, o-phenanthroline によっては阻害されなかった．NEM (100mM) およびペプスタチンA (50mM) では活性は各々約80%，77%に低下したが，完全には阻害されなかった．

II．ヒト好中球エラスターゼの基質特異性

1．ウシ不溶性エラスチン

図3は精製エラスターゼE2 による不溶性エラスチン分解能を示している．反応2時間後まで直線性が得られており，60ng (32.4mUnit) のエラスターゼによって1時間当たり5 μg のエラスチンが分解されることが示された．

2．ヒトI，II，III，IVおよびV型コラーゲン

図4にヒトI，II，III，及びV型コラーゲンのエラスターゼによる分解のパターンを示す．ヒトI型コラーゲンの分解については，SDS-PAGE での高分子量領域のバンドが消失していた．そのほかのバンドに質的な変化は見られなかった．ヒトIII型コラーゲンについてはエラスターゼの作用によって高分子量領域のバンドが消失するとともにαIII鎖のバンドが淡染化し，分子量約 75K のバンドが出現した．ヒトIIおよびV型コラーゲンについてはエラスターゼ作用の有無でバンドに変化は見られなかった．

IV型コラーゲンについては，エラスターゼ作用によるバンドの変化を経時的に検討した．図5に示されるのは EHS 肉腫由来IV型コラーゲンにエラスターゼを作用させて得られた試料の SDS-PAGE (5% アクリルアミドゲル) 上のパターンである．α 2 (IV), pro α 2 (IV), pro α 1 (IV), γ (IV) のバンドの淡染化とともに分子量約 100K, 85K および 68K のバンドが出現した．また，pro α 2 (IV) よりわずかに低分子量領域に2本のバンドが出現した．さらに高分子量領域よりβ 11 (I) 領域に相当するバンドが出現した．分子量 100K と 85K のバンドは還元の有無によって差が認められなかった．ヒト胎盤由来IV型コラーゲンのエラスターゼによる分解の SDS-PAGE 上のパターンをみると，α 2 (IV) およびγ (IV) のバンドが殆ど消失し，分子量 100K と 85K のバンドが出現していた．さらに，高分子量領域からβ 12 (I) 領域に相当するバンドが出現していた．

3．ラミニン，フィブロネクチン，およびプロテオデルマタン硫酸

図6はラミニンに精製エラスターゼE2 を作用させて得た試料の SDS-PAGE 上のパターンである．ラミニンは分子量約400K のA鎖，約 200K のB鎖ともに分解され，SDS-PAGE 上分子量約 120K の領域にバンドが出現した．このバンドも反応が進むに従って分

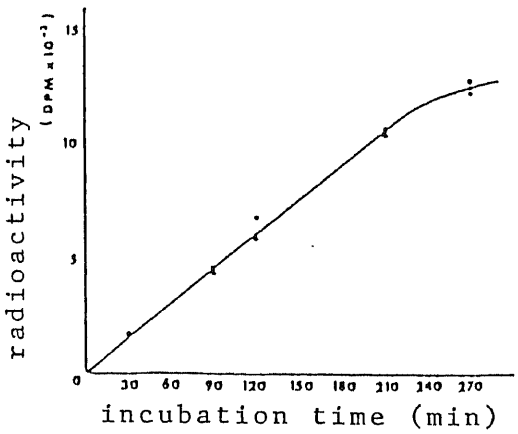

Fig. 3. Kinetic analysis of the ^{3}H-labeled elastin-hydrolyzing activity of elastase (E2) as a function of incubation time. ^{3}H-labeled gelatin (20μg, 120,000dpm) was incubated with elastase (60 ng) for the times indicated.

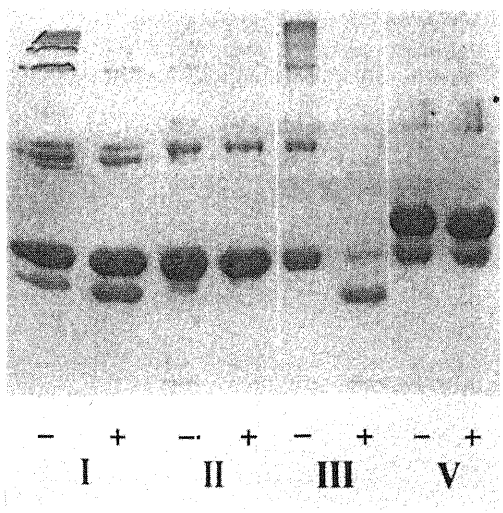

Fig. 4. Degradation of type I, II, III and V collagen. Each collagen (20μg) was incubated with elastase E2 (15μg) for 21 hr at 25°C. The reaction products were analysed on SDS-PAGE (5% total acrylamide) under the reduced conditions after the incubation.

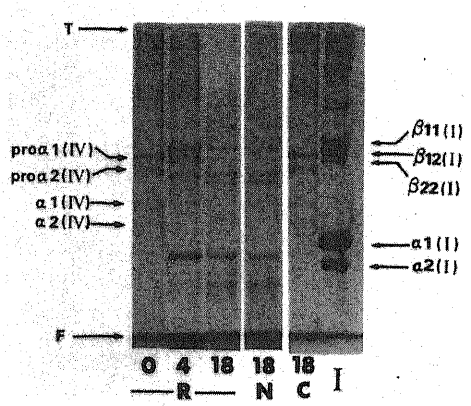

Fig. 5. Degradation of type IV collagen. Type IV collagen (20μg) was incubated with elastase E2 (20ng) for 0-24 hr at 25°C. The reaction products were analysed on SDS-PAGE (5% total acrylamide) under the reduced (R) or non-reduced (N) condition after the incubation. Number of each lane indicates the incubated time (hours). I, type I collagen and C, contorl for reduced type IV collagen after 18hr incubation.

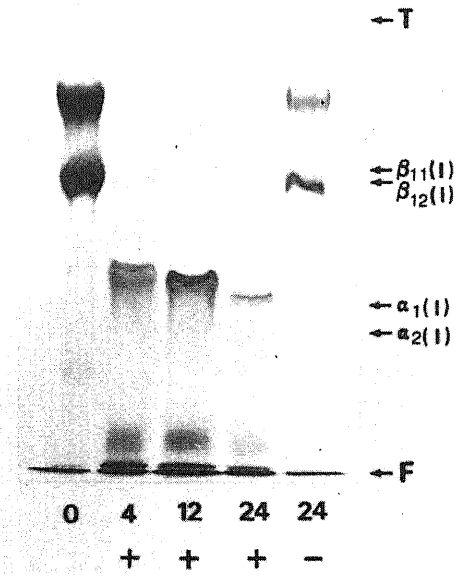

Fig. 6. Degradation of laminin. Laminin (20μg) was incubated with elastase E2 (20ng) for 0, 4, 12, or 24 hr at 37°C. The reaction products were analysed on SDS-PAGE (5% total acrylamide) under the reduced condition after the incubation with (+) or without (−) elastase.

子量の低下がみられた．E1 を作用させた場合も E2 の場合と比較してバンドのパターンに差異が見られなかった．図 7 は細胞性フィブロネクチンにエラスターゼ E2 を作用させて得た試料の SDS-PAGE 上のパターンである．図に示されるごとく細胞性フィブロネクチンのエラスターゼによる分解が確認された．分解の初期には分子量約 140K, 115K および 81K の計 3 本のバンドが出現したが，反応が経過するに従ってこれらのバンドは消失した．なお，血漿フィブロネクチンもまったく同様の分解パターンを示していた．図 8 はプロテオデルマタン硫酸にエラスターゼ E2 を作用させて得た試料の SDS-PAGE 上のパターンを示してい

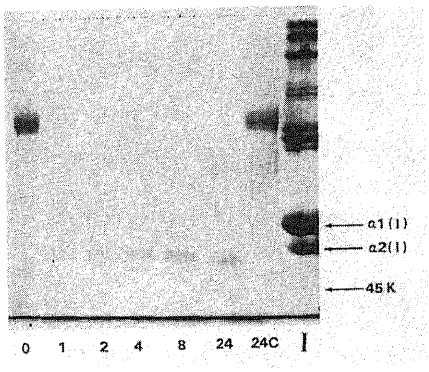

Fig. 7. Degradation of fibronectin. Cellular fibronectin (20μ g) was incubated with elastase E2 (20ng) for 1, 2, 4, 8, 24 hr, at 37°C. The reaction products were analysed on SDS-PAGE (5% total acrylamide) under the reduced contition after the incubation.

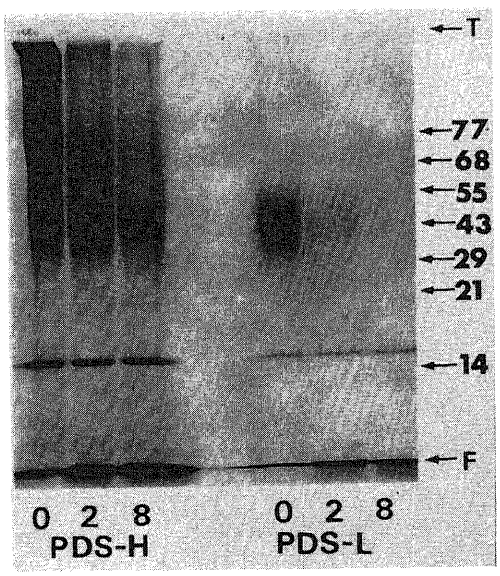

Fig. 8. Degradation of proteodermatan sulfate (PDS) with high (H) or low (L) molecular weight. Either PDS (20μ g) was incubated with elastase E2 (60ng) for 2, or 8 hr at 37°C. The reaction products were analysed on SDS-PAGE (10% total acrylamde) under the reduced condition after the incubation.

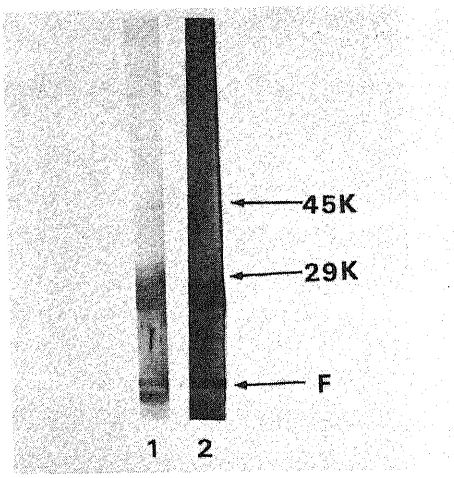

Fig. 9. Immunoblot analysis of the produced antibody. The fraction eluted from aprotinin--agarose column was charged on SDS-PAGE. The proteins on the gel were immediately transfered onto the nitrocellulose paper. The paper was stained by Aurodye (1) or reacted with the produced monoclonal antibody (2). Ther reaction of the antibody restricted to the elastase is shown.

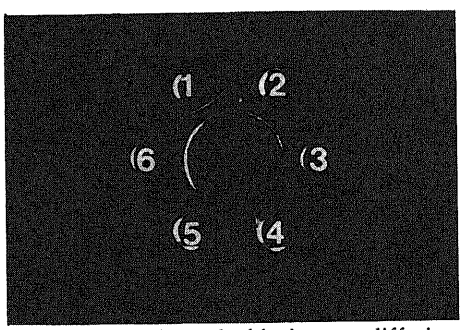

Fig. 10. Ouchterlony double immunodiffusion of the produced antibody against antimouse immunoglobulins. Antibody against mouse IgG_1 (1) IgG_{2a} (2), IgG_{2b} (3), IgG_3 (4), IgA (5) or IgM (6) is filled in the well. Single line is shown between the produced monoclonal antibody and the anti-mouse IgG_1.

る．図のごとく，プロテオデルマタン硫酸は高分子量画分，低分子量画分ともに時間を経るに従って低分子量化していった．

Ⅲ．作製単クローン抗体の性質

精製した抗ヒト好中球エラスターゼ単クローン抗体が反応するタンパクをウェスタンブロッティング法(イムノブロッティング法)を用いて検討した．図9にその結果をしめす．図9-1はアプロチニンアガロースクロマトグラフィにて溶出されたエラスターゼ画分をSDS-PAGE後，ニトロセルロース膜に転写し，Aurodye染色を施したもので，図9-2は転写後イムノブロッティング法に従って検出された単クローン抗体反応性タンパクのパターンである．図に示されるごとく作製抗体はエラスターゼE1とE2のみに反応することが確認された．

図10に作製した単クローン抗体のサブクラスをマウスモノクローナルタイピングキットにて検討した結果を示す．作製抗体と抗マウス IgG_1 との反応による免疫沈降線一本のみが出現した．

エラスターゼのゼラチン分解活性に対する作製抗体の影響を検討したところ，精製抗体の濃度に関係なく一定のゼラチン分解活性が認められた．

Ⅵ．炎症組織におけるヒト好中球エラスターゼの局在

1．気管支肺炎

組織学的には細気管支，肺胞腔および肺胞壁に好中球およびマクロファージの浸出が特徴的であった．細気管支および肺胞上皮細胞は所々変性剝離し，部分的に肺胞壁の破壊消失が伴われていた．EVG染色では肺胞壁の弾性線維に断裂，破壊がみられた．

図11は同組織を作製した抗ヒト好中球エラスターゼ抗体にて免疫染色した後，ワイゲルトの弾性線維染色を施したものである．図に示されるごとく，抗エラスターゼ抗体は好中球の胞体には顆粒状に強陽性，細胞

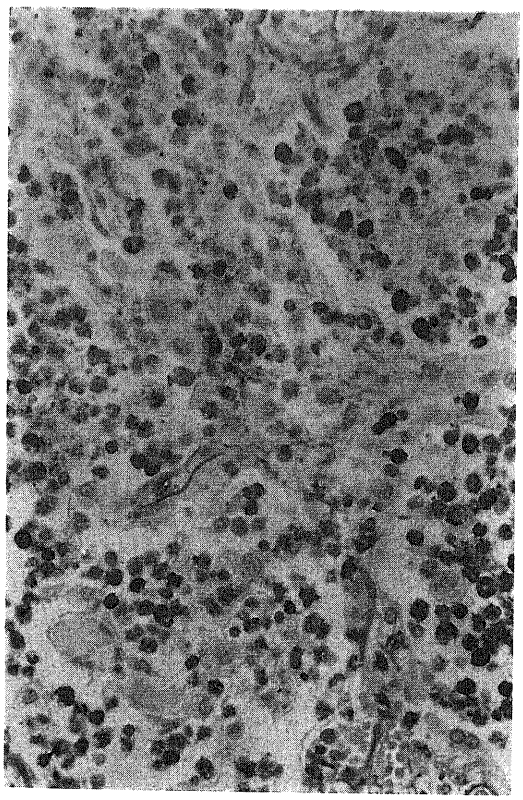

Fig. 11. Light micrograph of lung tissue with bronchopneumonia immunostained for neutrophil elastase followed by Weigert's stain. Elastase is stained in and around the neutrophils. ×300.

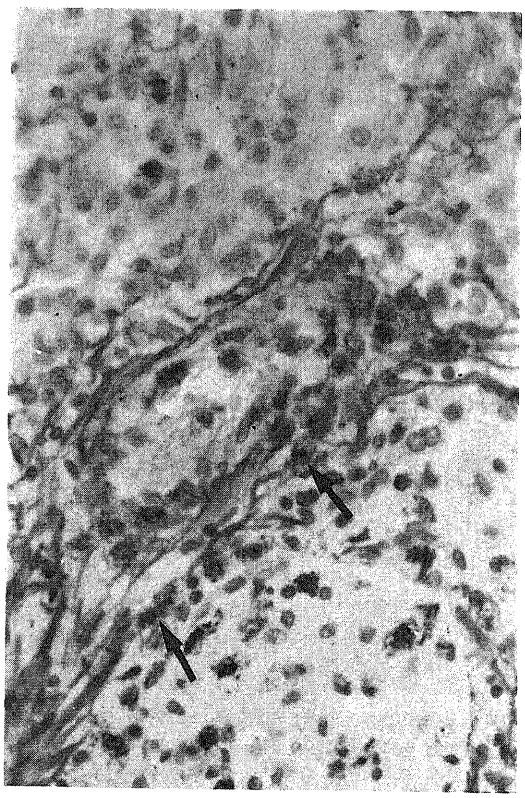

Fig. 12. High power view of lung tissue with bronchopneumonia immunostained for neutrophil elastase followed by Weigert's stain. Neutrophil elastase is shown associated with fragmented elastic fibers (arrows). ×600.

外ではびまん性弱陽性に反応していた．断裂した弾性線維に接してエラスターゼが細顆粒状に染色されているところもみられた (図12).

2．結節性多発動脈炎 (PN)

PN 症例の小腸組織を組織学的に検討した．病変部の粘膜上皮は融解壊死に陥り，腸管壁の全層にわたって好中球を主体とする著しい炎症細胞浸潤と出血がみられた．腸管壁の中・小動脈にはフィブリノイド血管炎がみられ，限局性または全周性にフィブリノイド壊死と好中球，マクロファージ，リンパ球らの浸潤がみられた．EVG 染色では炎症の激しい部位において動脈壁弾性線維の断裂破壊が認められた．同組織を作製した抗ヒト好中球エラスターゼ抗体にて免疫染色したのち，ワイゲルト染色を施して観察すると腸管壁全層に浸潤している好中球にエラスターゼが陽性であった．図13に示すごとく，動脈周囲にみられる好中球の胞体および細胞外の間質にエラスターゼが陽性に染め出され，この部分では血管壁の弾性線維の断裂崩壊がみられた．エラスターゼ免疫染色陽性部にほぼ一致して著しい弾性線維の破壊が認められた．PN 症例の皮膚においても腸管壁同様，血管壁に浸潤している好中球および間質にエラスターゼ陽性であり，同部位の弾性線維が崩壊していた．

3．慢性関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA)

組織学的に RA 活動期の増殖滑膜にはリンパ濾胞を伴うリンパ球浸潤に加えて所々好中球の浸潤がみられた．好中球は滑膜表層細胞層および滑膜内膜下層に散在し，関節腔内の浸出物には好中球の集簇がみられた．免疫組織化学的にはこれら好中球の胞体は抗エラスターゼ抗体に反応して染色されることが確認された．図14は活動期 RA 患者の関節腔から採取された浸出物について，作製した抗エラスターゼ抗体を用いて

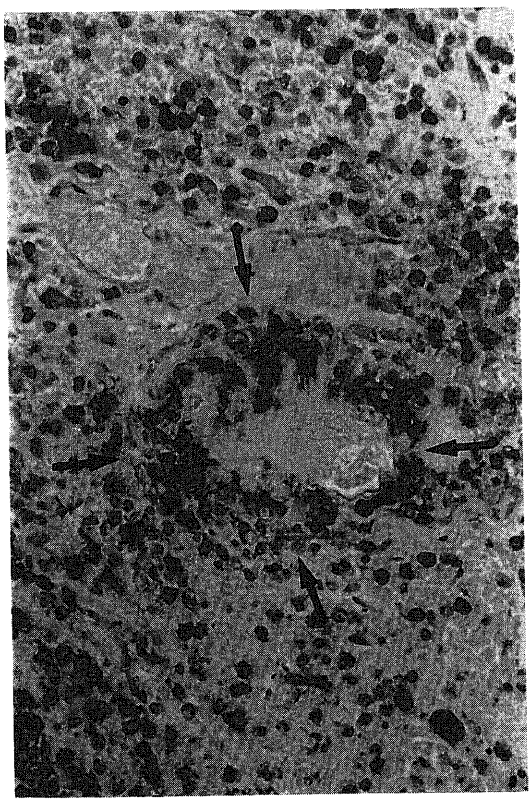

Fig. 13. Light micrograph of artery (arrows) of polyarteritis nodosa immunostained for neutrophil elastase followed by Weigert's staining. Neutrophils containing elastase, infiltrating within and around the arterial wall are demonstrated, accompanied by partial fragmentation of elastic fibers. Elastase is also shown extracellularly as fine granules. ×300.

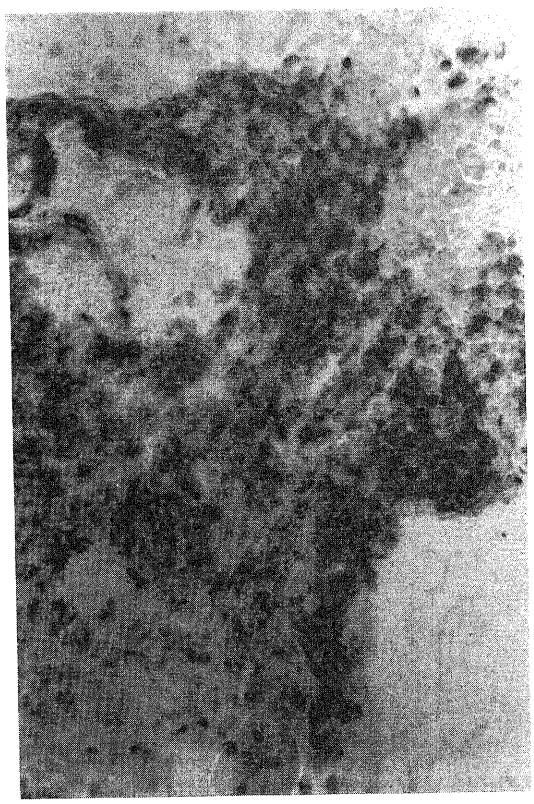

Fig. 14. Light micrograph of exudates from joint of rheumatoid arthritis immunostained for neutrophol elastase. Elastase is diffusely stained as fine granules. ×300.

免疫染色を施したものである．エラスターゼは好中球の胞体のみならず，浸出物中にも強く陽性であった．

なお，対照として，抗エラスターゼ抗体のかわりに正常マウス IgG を反応させたが，明らかな陽性所見は認められなかった．

考　　察

エラスターゼは「不溶性エラスチンを可溶化させる酵素」と定義[41]されており1949年 Balo と Banga[42]により最初に膵臓で発見された．現在では好中球[43][44]，血小板[43][44]，単球[45]~[47]，マクロファージ[48][49]，平滑筋細胞[50]，腫瘍細胞[51]らもエラスターゼを産生することが明らかになっている．本研究ではこれらのエラスターゼのうち炎症の進展に重要な意義を持つ好中球由来のエラスターゼに注目して実験を行った．同酵素の精製上の問題点，基質特異性，および炎症巣における局在とその役割について項目別に考察を加える．

まず好中球エラスターゼの精製上の問題点について述べる．好中球エラスターゼの精製方法については Baugh ら[26]，Heck ら[27]および Barret ら[12]がすでに報告している．彼等はアプロチニンカラムと CMC カラムが精製に不可欠であることを強調しており，第一段階のカラムクロマトグラフィとしてアプロチニンカラムを用いている

アプロチニンは膵臓に由来する分子量約65000のトリプシンインヒビターである．好中球エラスターゼとの結合性がトリプシンやキモトリプシンとの結合性に比較して低く，この点がアプロチニンカラムの特徴となっている．結合性が低いという性質には酵素が穏和な条件で溶出されるという利点があるが，夾雑物による干渉を受けやすいという欠点もある．アプロチニンとエラスターゼとの結合性を高めるために低塩濃度の緩和液にてカラムを平衡化した場合エラスターゼと夾雑タンパクとの疎水性結合が強まって，かえってアプロチニンとの結合性が低下する可能性がある．また，核酸の夾雑があれば塩基性タンパクである好中球エラスターゼに影響を与えるかも知れない．事実，Baugh ら[26]がアプロチニンカラムで100％の回収率を得ているのに対し，Heck ら[27]の報告では回収率はわずか19％であった．これはアプロチニンカラムに供した試料の違いによるものと推測される．つまり，Baugh らでは白血球の顆粒のみを厳密に抽出して用いているのに対し，Heck らでは核酸および核酸分解物が夾雑している試料を用いていると思われるのである．著者が白血球を超音波破砕して得た試料，すなわち核酸，細胞質成分および顆粒蛋白などの混合物をアプロチニンカラムに供したところ，相当量のエラスターゼが素通りした．また，これはカラム容量に対する過剰負荷によるものでないことも確認された．Heck らや本研究の結果からアプロチニンカラムに供する試料としては核酸及び核酸分解物などの夾雑物をふくまない顆粒画分のタンパクを用いることが重要であると考えられた．

つぎに Baugh らの方法[26]に従って顆粒蛋白のみの抽出を試みたところ，細胞膜を破壊する操作およびホモジナイザーを用いて顆粒蛋白を抽出する操作がきわめて繁雑であった．そこで著者は好中球を刺激することによって脱顆粒させるという方法を試みた．この方法で得られた顆粒蛋白画分のエラスターゼ活性は好中球を破砕して抽出したエラスターゼ活性の約30％であったが，Baugh らの方法に比べて簡便であり，とくに他のタンパクや核酸の夾雑を防ぐためには不可欠な操作と考えられる．

好中球顆粒蛋白にはエラスターゼやカテプシンGのほか，ゼラチナーゼおよびコラゲナーゼも共存している．したがってエラスターゼと，コラゲナーゼ，ゼラチナーゼおよびカテプシンGとを分離することが望ましい．Christner ら[7]の報告によれば好中球コラゲナーゼはアプロチニンセファロース 4B カラムに吸着されるという。ヘパリンカラムを用いた場合，コラゲナーゼ，ゼラチナーゼは全て素通ることが知られており，また著者もこれを確認したので，エラスターゼと，ゼラチナーゼ，コラゲナーゼとを分離する目的で著者はヘパリンカラムクロマトグラフィをエラスターゼ精製の最初の段階に用いた．ヘパリンカラムでのエラスターゼ活性の回収率は85％，精製率は6.9倍で，エラスターゼの精製にこのカラムは有効と考えられる．

CMC カラムは好中球エラスターゼとカテプシンGとの分離に有効である．カテプシンGは好中球エラスターゼより等電点の高いタンパクで，CMC カラムではエラスターゼより高い塩濃度 (0.45M NaCl 以上) で溶出される．本研究においては，カテプシンGはヘパリンカラムに供する試料のみならず，それ以降のエラスターゼ精製の過程を通じてその酵素活性は検出されなかった．カテプシンGは溶解度の低いタンパクであり，Baugh らの報告によれば，0.05M Tris-HCl, pH 7.6/0.05M NaCl 緩衝液にて試料を透析した際，析出した沈殿画分に検出される．今回エラスターゼ精製においては，ヘパリンカラムに供する以前の過程のカテプシンG活性は検討していないが，恐らく塩濃度 0.05M NaCl 緩衝液で透析した際に，沈殿画分に移行し，除かれたものと推測される．

CMC カラムクロマトグラフィは好中球エラスターゼのアイソザイムを分離するためにも有効である．Baugh ら[26]は CMC カラムクロマトグラフィを用いて 0.15M NaCl から0.3M NaCl までの塩濃度勾配でエラスターゼのアイソザイムを検討し，三峰性の活性パターンを得ている．さらに彼らは酸性ゲル電気泳動法を用いて 4 種のアイソザイムを分離し，おのおの E_1, E_2, E_3, E_4 と命名しているが，各アイソザイムの精製は行っていない．彼らの報告によれば，分子量29.5K の E_4 が主要成分で，アイソザイム全体の活性の約60%を占めている．著者は各アイソザイムの精製を目的として同様の方法を用いて，二峰性の活性を検出し，各々をポリアクリルアミドゲル電気泳動上単一のバンドとして精製した．同酵素は分子量が約 25K で，エラスターゼであることは不溶性エラスチンの分解能をもって確認された．また同酵素がセリンプロティナーゼに分類されることはインヒビターを用いた阻害実験によって確かめられた．Baugh らの結果と照合すると，著者の精製した E2 は Baugh らの命名した E_4 に対応し，著者の命名した E1 は Baugh らの E_1, E_2, E_3, の混合物に相当するものと思われる．

現在では好中球エラスターゼのアミノ酸配列は決定されており，アイソザイムは糖付加の差によるものと考えられている[52]．しかし，各アイソザイムは単離精製されておらず，基質分解能や酵素の安定性，アイソザイムを生じる細胞内プロセッシングの差異らは明らかにされておらず今後の検討が必要と考えられる．

次に好中球エラスターゼの基質特異性について述べる．好中球由来のエラスターゼはエラスチン分子のデスモシン，イソデスモシン近傍に存在する Val-X あるいは Ala-X の部位を切断する[53]が，エラスチンのみならず他の細胞間マトリックス成分も分解することが知られている[16)~24)]．本研究においても，著者の精製したエラスターゼは不溶性エラスチン分解能のみならずⅠ型コラーゲンの架橋分解能，Ⅲ型コラーゲン分子鎖内の切断能，Ⅳ型コラーゲン，ラミニンおよびフィブロネクチンに対する限定的分解能，プロテオグリカン分解能を有していた．ここでは好中球エラスターゼのエラスチン以外のマトリックス分解能について考察を加えたい．

Ⅰ型およびⅡ型コラーゲンの分解能に関しては Starkey ら[16)17)]がブタ腱由来の試料を用いて，好中球エラスターゼがコラーゲンの分子間架橋を切断することを示している．Ⅲ型コラーゲンについては Gadek ら[19]および Mainardi ら[20]が，エラスターゼはコラーゲンの分子鎖を3/4と1/4とに切断することを報告している．今回好中球エラスターゼによるⅠ型，Ⅱ型，Ⅲ型コラーゲンの分解について検討したところ，SDS-PAGE 上のバンドのパターンをみるかぎり，Ⅰ型とⅢ型コラーゲンについてはこれまでの報告と同様の結果が得られた．Ⅱ型コラーゲンについては使用した基質が架橋を含まない画分だったため架橋の分解についての検討は不可能であった．しかし，エラスターゼのコラーゲンの分子鎖の分解能については，エラスターゼは分子鎖を切断しないという成績が得られた．

基底膜の構成成分であるⅣ型コラーゲンの分解については，Mainardi ら[21]が報告している．かれらはウシ水晶体包からペプシン消化して得た C1, C およびD断片を基質として，これらが好中球エラスターゼによって分子量 90K, 68K, 48K, 37K, 31K の計 5 種類の断片に分解されることを報告している．本研究においてはエラスターゼによってヒト胎盤由来および EHS 肉腫由来Ⅳ型コラーゲンが分解され分子量約 100K と 85K の産物が得られた．Mainardi らの報告と今回得られた結果とから，エラスターゼがⅣ型コラーゲンのC末端から分子量約 90-100K 部位の少なくとも 1 カ所を切断すると考えられる．好中球にはエラスターゼとは別にⅣ型コラゲナーゼが存在することが Tshesche ら[54]によって報告されている．彼らはⅣ型コラゲナーゼが α 鎖の 7S 付近約1/3の部分を切断することを示している．エラスターゼとⅣ型コラゲナーゼの切断部位が異なることから両者の協同作用による複数箇所の切断によってⅣ型コラーゲンの架橋構造 (spider form) が破壊されるものと推測される．

ラミニンも基底膜成分の一つであり，ラミニン分子は独特の十字架構造をしている．ラミニンはⅣ型コラーゲン，プロテオヘパラン硫酸，ナイドジェンら，他の基底膜成分および上皮細胞の細胞膜上のラミニンリセプターとの結合能を有し，基底膜構造の保持に役立っていると考えられている[55)~57)]．好中球エラスターゼによるラミニンの分解についてはこれまでに報告がない．本研究において著者はラミニンのA鎖及びB鎖に対する好中球エラスターゼの限定的分解能を確認し，アイソザイム E1 と E2 とでその分解産物の SDS-PAGE 上のパターンに差がないことを示した．従って好中球エラスターゼはⅣ型コラーゲンを分解するのみならず，ラミニンの十字架構造を破壊することによって基底膜構造の崩壊を促進しているものと想像される．

ラミニンと並んで結合組織に存在する糖タンパクとしてフィブロネクチンがあげられる．フィブロネクチ

ンは動物細胞表面や組織体液中に存在し，その生理機能として細胞の接着，伸展，移動，増殖，分化など細胞の基本的活動に関与する機能があげられる[58]．好中球エラスターゼによるフィブロネクチンの分解については McDonald ら[22]がすでに報告している．彼らはエラスターゼが血漿フィブロネクチンを限定分解し，これによって細胞と細胞間マトリックスとの相互関係の環境が変化することを示唆している．今回著者は血漿フィブロネクチンの他に細胞性フィブロネクチンに対するエラスターゼの作用も検討した．その結果，エラスターゼは血漿および細胞性フィブロネクチンとも同様に分解することが示唆された．本研究において，フィブロネクチンの分解で出現した分子量約 140K および 54K の断片は分子量的に McDonald らの報告[22]と一致するが，分子量 115K 及び 81K の断片など彼らの報告と異なる所見もみられている．この不一致の理由は明らかでないが，基質の調製方法の差が関係しているのかもしれない．

好中球エラスターゼによるプロテオグリカンの分解についてはこれまで Malemud ら[23], Starkey ら[17], および Schalkwijk ら[24]が報告している．Malemud らはエラスターゼを含む顆粒画分を，Starkey らと Schalkwijk らは精製好中球エラスターゼを軟骨に作用させることによってそれぞれプロテオグリカンの分解を検討し，同酵素のプロテオグリカンの分解能を指摘している．本研究において著者は精製プロテオデルマタン硫酸を用いて好中球エラスターゼのプロテオグリカンのコアタンパクを分解することを SDS-PAGE 上のバンドの変化をもって証明した．これまでに好中球エラスターゼによるプロテオグリカンの分解を，精製された基質を用いて検討した研究は報告されておらず，本研究が最初である．

最後に炎症組織における好中球エラスターゼの局在について述べる．上述のように in vitro においてエラスチンをはじめとして種々の細胞間マトリックス由来のタンパクが好中球エラスターゼの基質となりうることが示された．著者は炎症性病巣における好中球エラスターゼの局在とその役割を検討する目的で精製したヒト好中球エラスターゼに対する単クローン抗体を作製した．精製した抗ヒト好中球エラスターゼ抗体が好中球エラスターゼに対し特異的であることは，ウェスタンブロッティング法により本抗体がエラスターゼ E1 と E2 のみに反応することから明らかである．また本抗体がエラスターゼのゼラチン分解活性をまったく阻害しないことから，本抗体のエピトープは活性に関与しない部位であると考えられる．この抗エラスターゼ抗体を用いて炎症組織における好中球エラスターゼの局在を免疫組織化学的に調べた．好中球エラスターゼの作用効果を組織学的に検討するにはエラスチンを主成分とする弾性線維を指標とするのが適当と考え，まず弾性線維の豊富な肺や血管における炎症性病変を対象とした．

気管支肺炎の肺組織では細気管支壁や肺胞腔および肺胞中隔に浸潤，集積している好中球の胞体や細胞外の間質にエラスターゼが証明された．好中球エラスターゼの強い陽性部位では組織の破壊がみられ，また，気管支壁や肺胞中隔の断裂した弾性線維に近接してエラスターゼが細顆粒状に局在していた．結節性多発動脈炎においても腸管壁および皮膚の中・小動脈の壁内と動脈周囲に浸潤している好中球の胞体および細胞外の間質にエラスターゼが染色され，血管壁の弾性線維が崩壊していた．肺や血管の細胞間マトリックスは線維成分を構成するエラスチンとコラーゲン，線維成分の間を満たすプロテオグリカン，およびフィブロネクチンやラミニンなどの糖タンパクを主な成分として組み立てられている．今回の組織学的および免疫組織化学的検索によって気管支肺炎と結節性多発動脈炎で好中球エラスターゼと弾性線維の崩壊が共存してみられたことは好中球エラスターゼがこれらの炎症性病変において実際に酵素活性を発揮し，エラスチンをはじめ他の細胞間マトリックス成分を分解していることを示唆している．好中球はエラスターゼの他にカテプシンG[14][15]，コラゲナーゼ[3)~10)]，ゼラチナーゼ[3)~6)]らのプロティナーゼや活性酸素も放出する．従って，炎症局所ではこれらのプロティナーゼと活性酸素らの協同作用によって組織の破壊がさらに進行するものと考えられる．

本研究では慢性関節リウマチの活動期における好中球エラスターゼの局在についても検討した．慢性関節リウマチおける好中球の役割についてはいくつかの報告がみられる[46)60)~62)]が，滑膜での好中球浸潤が軽度であることからこれまでその役割についてはあまり注目されていなかった．しかし，最近，Velvart と Fehr[31]は慢性関節リウマチ患者の関節軟骨について抗ヒト好中球エラスターゼ抗体を用いて免疫組織化学的検討を行い，好中球エラスターゼが同疾患における関節軟骨破壊に関与することを示唆した．また，山下[63]も慢性関節リウマチの実験モデルにおいて関節軟骨破壊に好中球エラスターゼが重要な役割を果たす可能性を指摘している．本研究においては増殖した滑膜内に浸潤する好中球の胞体や関節腔内の浸出物にエラスターゼが強く陽性であることを確認した．従って好中

球エラスターゼが関節軟骨破壊に関与しているように思われる．

一方，生体内には各種プロティナーゼインヒビターが存在し，プロティナーゼの作用を調節している．好中球エラスターゼのインヒビターとしてはα_1-プロティナーゼインヒビター(α_1-P1)，α_2マクログロブリン，Inter-α-trypsin inhibitor が知られており，とくにα_1-P1 が好中球エラスターゼ作用の90%以上を担っている．α_1-P1 は血中に 200－300mg/dl の濃度で存在し，エラスターゼとはモル比が 1：1 で結合する[64]．従って，炎症部位では好中球エラスターゼに対してα_1-P1 が相対的に過剰の状態で存在していると考えられている．このような条件下において炎症局所で好中球エラスターゼが作用するのは，1）好中球と基質との接触によってα_1-P1 分子の接近が妨げられる[65]，2）マクロファージ由来エラスターゼがα_1-P1 を分解する[66]，3）好中球の放出するスーパーオキシドがα_1-P1 の活性を担う 358-Met を Met-sulfoxide に変化させることによってα_1-P1 の活性が失われる[67]などによるものと考えられている．このような点を考えると単クローン抗体に反応するエラスターゼの局在は複雑な炎症反応の一側面を明らかにするものにすぎないのかも知れないが，好中球を巻き込む病変の解析には今後大いに役立つと考えられる．

結　　論

ヒト好中球エラスターゼを精製し，本酵素の基質特異性を検討した．また，精製した好中球エラスターゼに対する単クローン抗体を作製し，炎症組織における本酵素の局在を免疫組織化学的に観察し，次の結果を得た．

1．エラスターゼはヘパリンアミノセルロファイン，アプロチニンアガロース，カルボキシメチルセルロースの3本のカラムによって2種のアイソザイム(E1, E2 と命名) として精製され，SDS-PAGE 上各々分子量約25000の単一標品として泳動された．本酵素の精製率は E1＝204倍，E2＝120倍で，回収率は合わせて23%であった．

2．精製エラスターゼは不溶性エラスチンを分解し，I型コラーゲンの分子間架橋やIII型コラーゲンの分子鎖を切断しIV型コラーゲン，ラミニン，フィブロネクチンについても限定的分解能を示した．さらにプロテオグリカンに対する分解能も確認され，本酵素の広い基質特異性が示された．

3．作製した本酵素に対する単クローン抗体は，サブクラス IgG_1で，ウェスタンブロッティング法よりエラスターゼ E1 と E2 のみに特異的に反応することが示された．また，抗体はエラスターゼのゼラチン分解活性を阻害しなかった．このデータは本抗体のエピトープが活性に関与しない部位であることを示している．

4．作製した単クローン抗体を用いて気管支肺炎，結節性多発動脈炎および慢性関節リウマチの，炎症局所におけるエラスターゼの局在について検討したところ，好中球の胞体のみならず細胞間質にも陽性に染色された．気管支肺炎，結節性多発動脈炎ではエラスターゼの分布に一致して弾性線維の崩壊がみられた．

以上の結果は好中球エラスターゼが炎症局所において実際に酵素活性を発揮し，エラスチンをはじめ，ほかの細胞間マトリックス成分を分解していることを示唆している．また，抗ヒト好中球エラスターゼが抗体を用いた免疫組織化学的検索が好中球の関与する各種疾患の病態解析に有効な手段であると考えられた．

謝　　辞

稿を終えるにあたり，御指導，御校閲を賜りました中西功夫教授に深甚なる謝意を表します．本研究について終始御指導を賜りました東京医科歯科大学難治疾患研究所，永井裕教授に心より感謝致します．また，形態学的検索について御指導戴きました勝田省吾助教授，材料を提供して下さいました金沢大学医療技術短期大学部岡田保典助教授，本教室の河原栄講師に深謝致します．本研究遂行に際して御助言御協力を戴きました本教室ならびに東京医科歯科大学難治疾患研究所の教室員各位に厚く御礼申し上げます．

文　　献

1） **Robbins, S. L. & Kumar, V.:** Inflammation and repair. *In* S. L. Robbins & V. Kumar (eds.), Basic Pathology, 4th ed. p28-61, W. B. Saunders Company, Philadel phia, 1987.

2） **Fritz, H. & Jochum, M.:** Granulocyte proteinases as mediators of unspecific proteolysis in inflammation; a review. Folia Histochem. Cytobiol., **24,** 99-116 (1986).

3） **Murphy, G., Bretz, U., Baggiolini, M. & Reynolds, J.:** The latent collagenase and gelatinase of human polymorphonuclear neutrophil leucocytes. Biochem. J., **192,** 517-525 (1980).

4） **Murphy, G., Reynolds, J. J., Bretz, U. & Baggiolini, M.:** Partial purification of collagenase and gelatinase from polymorphonuclear leucocytes. Analysis of their actions on soluble and insoluble collagens. Biochem. J., **203,** 209-221 (1982).

5) **Engelbrecht, S., Pieper, E., MaCartney, H. W., Rautenberg, W., Wenzel, H. R. & Tschesche, H.:** Separation of the human leucocyte enzymes, alanine aminopeptidase, cathepsin G, collagenase, elastase and myeloperoxidase. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **363,** s305-315 (1982).

6) **Hibbs, M. S., Hasty, K. A., Seyer, J. M., Kang, A. H. & Mainardi, C. L.:** Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase. J. Biol. Chem., **260,** 2493-2500 (1985).

7) **Christner, P., Damato, D., Reinhart, M. & Abrams, W.:** Purification of human neutrophil collagenase and production of a monospecific antiserum. Biochemistry, **21,** 6005-6011 (1982).

8) **Rantala-Ryhanen, S., Ryhanen, L., Nowak, F. V. & Uitto J.:** Proteinases in human polymorphonuclear leukocytes. Purification and characterization of an enzyme which cleaves denatured collagens and a synthetic peptide with a Gly-Ile sequence. Eur. J. Biochem., **134,** 129-137 (1983).

9) **MaCartney, H. W. & Tschesche, H.:** Latent and active human polymorphonuclear leukocyte collagenases, isolation, purification and characterization. Eur. J. Biochem., **130,** 71-78 (1983).

10) **Callaway, J. E., Garcia, J. A., Hersh, C. L., Yeh, R. K. & Gilmore-Hebert, M.:** Use of lectin affinity chromatography for the purification of collagenase from human polymorphonuclear leukocytes. Biochemistry, **25,** 4757-4762 (1986).

11) **Janoff, A.:** Elastase in tissue injury, Ann. Rev. Med., **36,** 207-216 (1985).

12) **Barret, A. J.:** Leukocyte elastase. *In* L. Lorand (eds.), Methods in Enzymology, **80,** p581-588, Academic Press. Inc., Orland, 1981.

13) **Feinstein, G. & Janoff, A.:** A rapid method for purification of human granulocyte cationic neutral proteases. Purification and further characterization of human granulocyte elastase. Biochim. Biophys. Acta., **403,** 493-505 (1975).

14) **Feinstein, G. & Janoff, A.:** A rapid method for purification of human granulocyte cationic neutral proteases. Characterization of human granulocyte chymotrypsin-like enzyme. Biochim. Biophys. Acta., **403,** 477-492 (1975).

15) **Salvesen, G., Farley, D., Shuman, J., Przybyla, A., Reilly, C. & Travis, J.:** Moleucular cloning of human cathepsin G. Structural similarity to mast cell and cytotoxic T lymphocyte proteinases. Biochemistry, **26,** 2289-2293 (1987).

16) **Starkey, P. M.:** The effect of human neutrophil elastase and cathepsin G on the collagen of cartilage, tendon and cornea. Acta. Biol. Med. Germ., **36,** 1549-1554 (1977).

17) **Starkey, P. M., Barrett, A. J. & Bruleigh, M. C.:** The degradation of articular collagen by neutrophil proteinases. Biochim. Biophys. Acta, **483,** 386-397 (1977).

18) **Gadher, S. J., Eyre, D. R., Duance, V. C., Wotton, S. F., Heck, L. W., Schmid, T. M. & Wooley, D. E.:** Susceptibility of cartilage collagens type II, IX, X and XI to human synovial collagenase and neutrophil elastase. Eur. J. Biochem., **75,** 1-7 (1988).

19) **Gadek, J. E., Fells, G. A., Wright, D. G. & Crystal, R. G.:** Human neutrophil elastase functions as a type III collagen "collagenase". Biochem. Biophys. Res. Commun., **95,** 1815-1822 (1980).

20) **Mainardi, C. L., Hasty, D. L., Seyer, J. M. & Kang, A. H.:** Specific cleavage of human type III collagen by human polymorphonuclear leukocyte elastase. J. Biol. Chem., **255,** 12006-12010 (1980).

21) **Mainardi, C. L., Dixit, S. N. & Kang, A. H.:** Degradation of type IV (basement membrane) collagen by a proteinase isolated from human polymorphonuclear leukocyte granules. J. Biol. Chem., **255,** 5435-5441 (1980).

22) **McDonald, J. A. & Kelley, D. G.:** Degradation of fibronectin by human leukocyte elastase. Release of biologically active fragments. J. Biol. Chem., **255,** 8848-8858 (1980).

23) **Malemud, C. J. & Janoff, A.:** Identification of neutral proteases in human neutrophil granules that degrade articular cartilage proteoglycan. Arthritis Rheum., **18,** 361-368 (1975).

24) **Schalkwijk, J., Joosten, L. A. B., van den Berg, W. B. & van de Putte, L. B. A.:** Elastase secreted by activated polymorphonuclear leukocytes causes chondrocyte damage and matrix degradation in intact articular cartilage. Agents

Actions, **23**, 58-59 (1988).

25) Dewald, B., Rinder-Ludwing, R., Bretz, U. & Baggiolini, M.: Subcellular localization and heterogeneity of neutral proteases in neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. J. Exp. Med., **141**, 709-723 (1975).

26) Baugh, R. J. & Travis, J.: Human leukocyte granule elastase. Rapid isolation and characterization. Biochemistry, **15**, 836-841 (1976).

27) Heck, L. W., Darby, W. L., Hunter, F. A., Bhown, A., Miller, E. J. & Bennett, J. C.: Isolation, characterization and amino-terminal amino acid sequence analysis of human neutrophil elastase from normal donors. Anal. Biochem., **149**, 153-162 (1985).

28) Croker, J., Jenkins, R. & Burnett, D.: Immunohistochemical demonstration of leukocyte elastase in human tissues. J. Clin. Pathol., **37**, 1114-1118 (1984).

29) Damiano, V. V., Tsuang, A., Kucich, U., Abrams, W. R., Rosenbloom, J., Kimbel, P., Fallahnejad, M. & Weinbaum, G.: Immunolocalization of elastase in human emphysematous lungs. J. Clin. Invest., **78**, 482-493 (1986).

30) Damiano, V. V., Kucich, U., Murer, E., Laudenslager, N. & Weinbaum, G.: Ultrastructural quantitation of peroxidase- and elastase-containing granules in human neutrophils, Am. J. Pathol., **131**, 235-245 (1988).

31) Velvart, M. & Fehr, K.: Degradation in vivo of articular cartilage in rheumatoid arthritis and juvenile chronic arthritis by cathepsin G and elastase from polymorphonuclear leukocytes. Rheumatol. Int., **7**, 195-202 (1987).

32) Skubitz, K. M., Wehner, N. G. & Gray, B. H.: Preparation and chracterization of a monoclonal antibody that inhibits human neutrophil elastase activity. J. Leukocyte Biol., **44**, 158-165 (1988).

33) Sunada, H. & Nagai, Y.: A rapid microassay for gelationlytic activity using tritium-labeled heat-denatured polymeric collagen as a substrate and its application to the detection of enzymes involved in collagen metabolism. J. Biochem., **87**, 1765-1771 (1980).

34) Chodirker, W. B., Bock, G. N. & Vaughan, J. H.: Isolation of human PMN leukocytes and granules. Observations on early blood dilution and on heparin. J. Lab. Clin. Med., **71**, 9-19 (1968).

35) Absolom, D. R.: Basic methods for the study of phagocytosis. *In* G. D. Sabato & J. Everse (eds.), Methods in Enzymology, **132**, p95-182, Academic Press, Inc., Orland, 1986.

36) Banda, M., Werb, Z. & McKerrow, J. H.: Elastin degradation *In* L. W. Cunningham (ed.), Methods in Enzymology. **144**, p288-305, Academic Press, Inc., Orland, 1987.

37) Weber, K. & Osborn, M.: Proteins and sodium dodecyl sulfate: Molecular weight determination on polyacrylamide gels and related procedures. *In* H. Neurath, R. L. Hill & L. L. Boeder (eds.), The Proteins, Vol 1., 3rd ed., p179-223, Academic, Press, Inc., New York, 1975.

38) Goding, J. W.: Antibody production by hybridomas, J. Immunol. Meth., **39**, 285-308 (1980).

39) Douilland, J. Y., Hoffman, T. & Herberman, R. B.: Enzyme-linked immunosorbent assay for screening monoclonal antibody production: Use of intact cells as antigen. J. Immunol. Meth., **39**, 306-316 (1980).

40) Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76**, 4350-4354 (1979).

41) Bieth, J. G.: Elastases: Catalytic and biological properties. *In* R. P. Mecham (ed.), Regulation of Matrix Accumulation, lst ed., p217-320, Academic Press, Orlando, 1986.

42) Balo, J. & Banga, I.: Elastase and elastase-inhibitor. Nature, **164**, 491 (1949).

43) Robert, B., Szigeti, M., Robert, L., Legrand, Y. Pignaud. G. & Caen, J.: Release of elastolytic activity from blood platelets. Nature, **227**, 1248-1249 (1970).

44) Gardi, C. & Lungarella, G.: Isolation and partial characterization of rat elastolytic enzymes from various cells and tissues. Arch. Biochem. Biophys., **250**, 63-69 (1986).

45) Lavie, G., Zucker-Franklin, D., & Franklin, E. C.: Elastase-type proteases on the surface of human blood monocytes: Possible role in amyloid

formation. J. Immunol., **125**, 175-180 (1980).

46) Senior, R. M., Campbell, E. J., Landis, J. A., Cox, F. R., Kuhn, C. & Koren, H. S.: Elastase of U-937 monocytelike cells. J. Clin. Invest., **69**, 384-393 (1982).

47) Fine, R., Campbell, M. E. & Collins, J. F.: Elastolytic activity of peripheral blood monocytes. Connect. Tissue Res., **13**, 27-35 (1984).

48) Banda, M. J. & Werb, Z.: Mouse macrophage elastase. Purification and characterization as a metalloproteinase. Biochem. J., **193**, 589-605 (1981).

49) Gardi, C. & Lungarella, G.: Purication and characterization of elastase activity from rat alveolar and peritoneal macrophages. Arch. Biochem. Biophys., **259**, 98-104 (1987).

50) Laeke, D. S., Hornbeck, W., Brechemier, D., Robert, L. & Peters, T. J.: Properties and subcellular localization of elastase-like activities of arterial smooth muscle cells in culture. Biochim. Biophys. Acta., **761**, 41-47 (1983).

51) Zeidel, M., Nakagawa, S., Biempica, L. & Takahashi, S.: Collagenase and elastase production by mouse mammary adenocarcinoma primary cultures and cloned cells. Cancer Res., **46**, 6438-6445 (1986).

52) Sinha, S., Watorek, W, Karr, S., Giles, J., Bode, W. & Travis, J.: Primary structure of human neutrophil elastase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **84**, 2228-2232 (1987).

53) Yasutake, A. & Powers, J. C.: Reactivity of human leukocyte elastase and porcine pancreatic elastase toward peptide 4-nitroanilides containing model desmosine residues. Evidence that human leukocyte elastase is selective for cross-linked regions of elastin. Biochemistry, **20**, 3675-3679 (1981).

54) Tshesche, H., Fedrowitz, J., Kohnert, M, MaCartney, H. W., Michaelis, J., Kuhn, K. & Wiedemann, H.: Interstitial collagenase, gelatinase and a specific type IV/V (basement membrane) collagen degrading proteinase from human leukocytes. *In* H. Tchesche (ed.), Proteinases in Inflammation and Tumor Invasion, Review Articles. p225-244, Walter de Gruyter, Berlin, 1986.

55) Timpl, R. & Rohder, H.: Laminin-a glycoprotein from basement membranes. J. Biol. Chem., **254**, 9933-9937 (1979)

56) Amenta, P. S., Gay, S., Vaheri, A & Martinez-Hernandez, A.: The extracellular matrix is an integrated unit: Ultrastructural localization of collagen types I, III, IV, V, VI, fibronectin, and laminin in human term placenta. Collagen Rel. Res. **6**, 125-152 (1986)

57) Hakomori, S., Fukuda, M., Sekiguchi, K. & Carter, W. G.: Fibronectin, laminin, and other extracellular glycoproteins. *In* K. A. Piez & A. H. Reddi (eds.), Extracellular Matrix Biochemistry, p229-276, Elsevier, New York, 1984.

58) Murphy-Ullrich, J. E. & Mosher, D. F.: Fibronectin and disease processes. In J. Uitto & A. J. Parejda (eds.), Connective Tissue Disease, p455-473, Marcel Dekker, Inc., New York, 1987.

59) Rosenbloom, J.: Biology of Desease. Elastin: Relation of protein and gene structure to disease. Lab. Invest., **51**, 605-623 (1984).

60) Bender, J. G., Van Epps, D. E., Searles, R. & Williams, Jr. R. C.: Altered function of synovial fluid granulocytes in patients with acute inflammatory arthritis: Evidence for activation of neutrophils and its mediation by a factor present in synovial fluid. Inflammation, **10**, 443-453 (1986).

61) James, D. W., Betts, W. H. & Cleland, L. G.: Chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes from rheumatoid joints. J. Rheumatol., **10**, 184-189 (1983).

62) Weissman, G. & Korchak, H.: Rheumatoid arthritis. The role of neutrophil activation. Inflammation., **8**, S3-14 (1984).

63) 山下直樹：陽イオン化ウシ血清アルブミン誘導関節炎における関節軟骨破壊機序．日全医会誌，**97**, 97-113 (1988).

64) Travis, J. & Salvesen, G. S.: Human plasma proteinase inhibitors. Ann. Rev. Biochem., **52**, 655-709 (1983).

65) Campbell, E. J., Senior, R. M., McDonald, J. A. & Cox, D. L.: Proteolysis by neutrophils: Relative importance of cell substrate contact and oxidative inactivation of proteinase inhibitors in vitro. J. Clin. Invest., **70**, 845-852 (1982).

66) Banda, M. J., Clark, E. J., Sinha, S. &

Travis, J.: Interaction of mouse macrophage elastase with native and oxidized human α_1-proteinase inhibitor. J. Clin. Invest., **79,** 1314-1317 (1987).

67) **Heidmann, H. & Travis, J.:** Human α_1-proteinase inhibitor. *In* A. J. Barret & G. Salvesen (eds.), Proteinase Inhibitors, lst ed., p441-456, Elsevier, Amsterdam, 1986.

Purification, Characterization and Immunolocalization in Inflammatory Tissue of Human Neutrophil Elastase

Hideto Watanabe, Department of Pathology (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., 98, 1—18 (1989)

Key words neutrophil elastase, inflammation, tissue destruction, monoclonal antibody, immunohistochemistry

Abstract

In order to investigate the role of neutrophil elastase in inflammatory tissue destruction, human neutrophil elastase was purified and examined on the substrate specificity. In addition, the monoclonal antiboody against the purified enzyme was produced and utilized in immunolocalization studies on inflammatory tissues. Human neutrophil elastase was purified by heparin-aminocellulofine, aprotinin-agarose and carboxymethyl-cellulose column chromatographs, as two isozyme fractions named E1 and E2 with molecular weight of 25,000. The enzyme demonstrated in vitro solubilization of insoluble elastin, cleavage of crosslinks of type I collagen, and intramolecular cleavage of type Ⅲ collagen. It also showed limited catalytic activity on type Ⅳ collagen, laminin and fibronectin and then degraded proteoglycan. Such a broad substrate specificity suggests that the neutrophil elastase will work in vivo, on the destruction of collagen and elastic fibers, basement membrane and ground substance in inflammatory tissues. The produced monoclonal antibody (IgG_1 subclass) had the epitope independent of the active center of the enzyme. Using this specific antibody, immunolocalization of the neutrophil elastase was studied on inflammatory tissues such as lungs of bronchopneumonia, small intestine and skin of polyarteritis nodosa, and synovium of rheumatoid arthritis. The elastase was identified both within neutrophils and extracellularly in the interstitium of these tissuse. In bronchopneumonia and polyarteritis nodosa, positive staining for elastase was found on and around the fragmented elastic fibers. These findings suggest that neutrophil elastase is actually involved in the tissue destruction and plays an important role on the inflammatory tissue injury. Immunohistochemical methods with the antibody produced against human neutrophil elastase will be a useful tool in the better understanding of the diseases mediated by neutrophils.