

実験的壊死性膵炎における膵線維化とコラゲナーゼ活性に関する研究

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	http://hdl.handle.net/2297/8990

実験的壊死性膵炎における膵線維化と コラゲナーゼ活性に関する研究

金沢大学大学院医学研究科外科学第二講座 (指導: 宮崎逸夫教授)

高 田 道 明

(昭和57年4月23日受付)

膵炎、ことに壊死性膵炎後に惹起される線維増生や脂肪組織への置換は、病態のみならず治療面においても重要な課題を有している。そこで、ラット膵凍結による実験的壊死性膵炎を作成し、膵の組織学的検索および膵組織中ヒドロキシプロリンの測定結果に基づく膵線維化の動態と膵組織中コラゲナーゼ活性との関連性を検索した。凍結処置を受けた膵は、早期における壊死、それに続く線維増生を示したが、これらの変化の大部分は終局的に脂肪組織への置換を生じた。膵組織中ヒドロキシプロリン量は、凍結処置後4週目まで次第に増加したが、5週目以降は軽度増加にとどまった。中性可溶性コラーゲンを基質とし、組織培養法を用いて測定された膵組織コラゲナーゼ活性は、2週目より認められ、5週目で最高に達したが、7週目以降では検出されなかった。また、ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動の検索により、その際にみられたコラーゲン基質の溶解は、コラゲナーゼに基づいていたことが確認された。以上の成績より、壊死性膵炎後において膵の線維化の進行に伴うコラゲナーゼ活性の上昇をみたが、この増生したコラーゲン線維の分解吸収にコラゲナーゼ活性は重要な役割を果していることが示唆された。

Key words 膵組織中ヒドロキシプロリン, KISO 法, 膵コラゲナーゼ活性, 組織培養法, 膵凍結法

急性膵炎の過半数は、適切な処置により機能障害を残すことなく治癒する。急性膵炎より慢性膵炎への移行は低率¹⁾であり、急性膵炎のうちの一部²⁾とされている。壊死性膵炎は組織学的に融解壊死がもっとも特徴的な所見であり、その壊死巣は終局的に脂肪組織に置換され、組織の線維化に移行するものは稀れであるといわれる。従って、膵における線維化過程は、他臓器とは異なる経過をとることが推測される。膠原線維を構成するコラーゲンは、生体における全蛋白質量の4分の1から3分の1を占める線維性蛋白質で、生理的条件下では安定であり、各種の非特異的な蛋白分解酵素の作用を受けても分解されることはないという。コラゲナーゼは、コラーゲンに特異的に作用し、三重螺旋構造を有する安定なコラーゲンのN末端より4分の3

の一点を切断し二分する酵素とされている。一旦、コラゲナーゼにより二分されたコラーゲンは、可溶性となり、体温で変性し、各種の非特異的な蛋白分解酵素の作用を受け、吸収されていく³⁾と考えられている。1962年、Gross & Lapierre⁴⁾は、オタマジャクシの皮膚を組織培養し、コラーゲン線維を溶解させることにより、動物性コラゲナーゼの検出に初めて成功した。その後、人の皮膚⁵⁾、子宮⁶⁾、角膜⁷⁾、関節膜⁸⁾等の各種臓器や組織でコラゲナーゼが証明されているが、いまだ膵組織での明確な検出はなされていない。そこで著者は、凍結法により、ラットに実験的壊死性膵炎を作成し、壊死巣の線維増生とその分解吸収過程において組織コラゲナーゼ活性を検索し、更に、膵線維化の消長に対するコラゲナーゼの役割について検討したので報告する。

A Study on Pancreatic Fibrosis and Collagenase Activity in Experimental Necrotizing Pancreatitis. **Michiaki Takata**, Department of Surgery (II), (Director: Prof. I. Miyazaki), School of Medicine, Kanazawa University.

対象および方法

I. 実験動物, 実験的壊死性膵炎作成法 および研究方法

体重 200~250 g の wistar 系雄性ラットを, ネンプタル (NEMBUTAL[®]) (5 mg/体重 100 g) の腹腔内投与による全身麻酔下¹⁰⁾で開腹した。次に, 膵の splenic segment¹¹⁾を, 二酸化炭素使用の凍結装置 Cryos-A (持田製薬) にて, 30 秒間凍結し閉腹した。このようにして作成された実験的壊死性膵炎ラットに対し, 膵凍結後 4 日目までは 1 日ごとに, その後は 1 週ごとに 15 週まで膵の組織変化, 膵組織中のヒドロキシプロリン (hydroxyproline) 量およびコラゲナーゼ (collagenase) 活性などを検索した。

なお, 膵組織採取は, 図 1 の如くに splenic segment を 3 区分し, A 区をヒドロキシプロリンの測定に, B 区を組織学的検索に, C 区をコラゲナーゼ活性の検出に供した。

II. 検査項目およびその方法

1. 血漿リパーゼ (lipase) およびアミラーゼ (amylase) の測定

膵外分泌酵素であるリパーゼおよびアミラーゼの測定は, 下大静脈より採取した静脈血につき行った。リパーゼは, BALB-DTNB 法 (リパーゼキット「マルビー」, 大日本製薬) にて測定した。アミラーゼは, ヨードデンプン比色法 (アミラーゼテストワコー, 和光純薬工業) にて測定した。アミラーゼアイソザイム

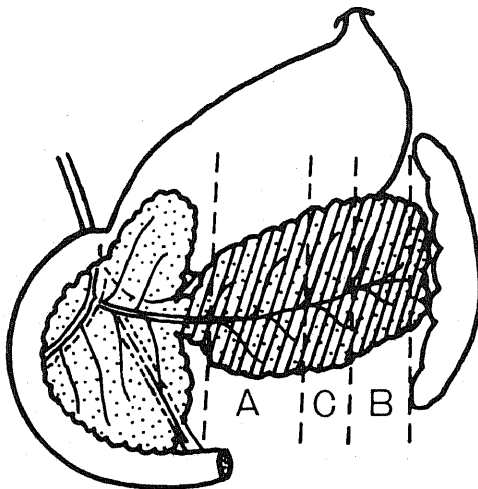


Fig. 1 Freezed area in the pancreas. ▨ freezed area. This area was divided into 3 parts for following examinations: A hydroxyproline level, B histological findings, C collagenase activity.

(amylase isozyme) は, タイタン III-Lipo (ヘルナ研究所) を支持体とする電気泳動法およびブルースターチ (blue starch) 濾紙密着法にて分離測定した。

2. 組織学的検索

ヘマトキシリン・エオジン (hematoxyline and eosin) 染色にて膵組織全体像の観察を行い, アザン (Azan) 染色にて組織中の線維の増減を観察した。

3. 膵の乾湿重量の比率の検索

膵組織中ヒドロキシプロリン量が実験的壊死性膵炎の各時期における炎症性浸出液の含有量に影響されることを除くため, また, 膵の組織中水分含有量の検索から膵の組織学的変化を知るために, 採取した膵組織片を -40°C , 12 時間凍結乾燥し, 乾湿重量の比率を求めた。

4. 膵組織中ヒドロキシプロリン量の測定

その測定には, KISO 法¹²⁾を用いた。

予め秤量したスクリーバイアル (S-1, 日電理化学硝子製) に採取した膵組織片を入れ, 組織湿重量を測定し, 次いで, これを凍結乾燥して組織乾燥重量を測定した。凍結乾燥した組織の入ったスクリーバイアルに, 1 g から組織乾燥重量を差引いた重量分の水を加え, さらに 12 N 塩酸 (hydrochloric acid) 1 ml を追加した。このバイアルを, テフロンとシリコンの二重のパッキングで密栓し, 110°C の油浴中で 24 時間, 加水分解した。次に, オキシプロリン (oxyproline) 1~30 μg に相当する加水分解後の資料を共通すり合せ試験管に加え凍結乾燥した後, 蒸留水を 4 ml 加え, さらに 2 ml のほう酸緩衝液 (potassium borate buffer solution) (ほう酸 (boric acid) 6.184 g と塩化カリウム (potassium chloride) 22.5 g を 60 ml の蒸留水に溶解し, 水酸化カリウム (potassium hydroxide) 溶液で pH 8.7 に調整後, 蒸留水を加えて 100 ml とする) を追加し, 20 分間混和した。その後, 1 ml のクロラミン T (chloramin T) 溶液 (クロラミン T 5.63 g をメチルセルソルブ (methyl cellulose) に溶かし, 100 ml とする) を資料に加え, すぐ混和し, 25 分後, チオ硫酸ソーダ (sodium thiosulfate) 溶液 (チオ硫酸ソーダ 89.34 g を水に溶かし, 100 ml とする) 3 ml を加えた。さらに, これにトルエン (toluene) 5 ml を加えて密栓し, 沸騰水浴中で 30 分間加熱し, 次いで冷却後, 5 分間静置した。トルエン層を 4.5 ml とり, ほう硝カルラム (sodium sulfate column) を通過させ, 得られた澄明液の 2.5 ml を採取し, これに 1 ml のエールリッヒ試薬 (Ehrlich's reagent) (濃硫酸 (concentrated sulfuric acid) 6.85 ml を 50 ml の無水エタノール (absolute ethanol) に加え, 冷却する。これとは別に, 無水エタノール 50 ml に p-デメチルアミノベンズ

アルデヒド (p-dimethylaminobenzaldehyde) 30 g を加える。これに前述のエタノール溶液を加えて攪拌する)を加えてすぐに混和した。混和 30 分後、ダブルビーム分光光度計を用い、650 nm でベースラインを零に合せた後、560 nm で吸光度を測定し、予め作製した標準曲線より、各資料のヒドロキシプロリン量を求めた。

なお、標準曲線は、市販のヒドロキシプロリンを用い、その各々 1, 5, 10, 15, 20, 30 μg に上記と同様の操作を加え、吸光度を測定することにより得た。

5. コラーゲナーゼ活性の測定

1) 中性可溶性コラーゲン (neutral soluble collagen) (基質) の抽出

腭組織コラーゲナーゼ活性を中性領域の生理的条件下で検出するために、Kang ら¹³⁾の方法に従い、幼若ラット (wistar 系、体重 80 g) の皮膚より中性可溶性コラーゲンを抽出した。

なお、全ての操作は、5°C以下で行った。

剃毛後剥離したラット皮膚を細切し肉挽機で破砕した後、この資料に 1 M 塩化ナトリウム (sodium chloride) を含んだ 5 倍量の 0.05 M トリス緩衝液 (tris buffer solution) (pH 7.0) を加え、48 時間、時々静かに攪拌して粗コラーゲンの抽出を行った。この抽出液を遠心 (13,000 g, 1 時間) し、不溶物を除去し、次いで、この溶液に塩化ナトリウムを 20% になるまで加え、塩析を行った。得られた沈澱物を遠心にて収集した後、蒸留水に再溶解し不溶物を遠心にて除去した。同様の操作にて再びこのコラーゲン溶液を塩析した。得られた沈澱物を遠心にて収集した後、0.5% 酢酸 (acetic acid) に溶解し、0.5% 酢酸にて充分に透析を行い、脱塩した。透析後の溶液を遠心し、不溶物を除去した後、0.02 M 磷酸二ナトリウム溶液 (dibasic sodium phosphate solution) にて再び 3 日間透析した。沈澱したコラーゲンを、遠心にて収集した後、0.5% 酢酸に溶解した。この溶液に、塩化ナトリウムを 5% になるように加え、生じた沈澱物を遠心にて収集し、0.5% 酢酸で再び透析した。その後、遠心にて不溶物を除去した後得られたコラーゲン溶液を凍結乾燥し、冷凍保存した。

2) 再生コラーゲン線維の作製

上述の方法で得たコラーゲン 0.5 g を、100 ml の 0.4 M 磷酸緩衝液 (phosphate buffer) (pH 7.6) に溶解後、0.4 M 塩化ナトリウム溶液にて 24 時間透析を行い¹⁴⁾、遠心 (13,000 g, 1 時間) にて不溶物を除去した。このコラーゲン溶液 250 μl を、マイクロシャーレの内室 (直径 15 mm, 深さ 2 mm) に注入し、外室 (直径 26 mm, 深さ 5 mm) には、ペニシリン G (penicillin G)

150 u/ml, ストレプトマイシン (streptomycin) 140 μg/ml を加えたタイロッド液 (Tyrode solution) (塩化ナトリウム 2.87 g, 塩化カリウム (potassium chloride) 0.2 g, 塩化カルシウム (calcium chloride) 0.2 g, 塩化マグネシウム (magnesium chloride) 0.1 g, 炭酸水素ナトリウム (sodium bicarbonate) 1 g, グルコース (glucose) 1.6 g, 水 1,000 ml)⁶⁾ を満たし、36°C, 4 時間培養し、再生コラーゲン線維を作製した。

3) 腭組織コラーゲナーゼ活性の測定

採取した腭組織片の一部 (2 × 2 × 2 mm³片) を、上述のタイロッド液の塩化ナトリウムを 8 g とし、磷酸二水素ナトリウム (monobasic sodium phosphate) 0.05 g を追加した動物性タイロッド液 (mammalian Tyrode solution)⁶⁾ でよく洗滌した後、これを予め作製した再生コラーゲン線維の上のせ、酸素 95%, 二酸化炭素 5% の高湿度培養器内で、36°C, 24 時間組織培養した。コラーゲナーゼ活性の判定は、Grillo ら⁹⁾の方法に従い、腭組織周囲に形成された基質の溶解程度を以下の 5 段階に分けることにより表現した。すなわち、(0) は溶解が全くみられないもの、(±) は腭組織周囲にわずかにみられるもの、(+++) は大部分が溶解したものとし、(±) と (+++) の間を溶解輪の大小に応じて (+) または (++) とした (図 2)。

6. 中性可溶性コラーゲンおよびその溶解産物の検討

基質として精製した中性可溶性コラーゲンが純粋であること、腭組織培養により溶解のみられた際の反応生成物がコラーゲナーゼによる分解であることを検討するために、ポリアクリルアミドゲル (polyacrylamide gel) ディスク電気泳動による検索を行った。

なお、電気泳動の操作手順は Ornstein & Davis¹⁵⁾¹⁶⁾の方法により行い、また、試薬は Nagai ら¹⁷⁾の方法により作製したものをを用いた (表 1)。

精製コラーゲンの検索には、前述の凍結乾燥したコラーゲンを 0.06 M 酢酸緩衝液 (acetate buffer) (pH 4.8) に溶解し、45°C, 10 分間熱変性させたもの

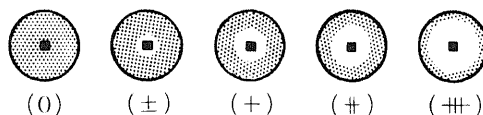


Fig. 2. Grades of collagenase activity. The scale of collagenase activity was graded (0) to (+++), with (0) indicating no visible lysis, (+++) almost full lysis of the collagen gel substrate., ■ pancreatic tissue; □, reconstituted neutral soluble collagen gel.

を資料とした。一方、臍組織培養により溶解のみられた際の基質は、30%硫酸アンモニウム (ammonium sulfate) にて沈澱させ、遠心にて資料を収集した後、これをさらに30%硫酸アンモニウムにて洗滌し、遠心を繰り返した¹⁸⁾。このようにして得られた沈澱物を0.1 M 酢酸に溶解し、0.05 M 酢酸にて透析した後、凍結乾燥した。更に、これを0.06 M 酢酸緩衝液 (pH 4.8) に溶解し、45°C、10 分間熱変性させ、資料とした。

成 績

1. 血漿リパーゼおよびアミラーゼの推移

1) リパーゼ

血漿リパーゼの各時期における測定結果は、以下の如くであった。

正常ラットのリパーゼ値は、119.4±51.3 BALB 単位/0.05 ml (mean±S. D., n=12, 以下同じ) であったが、臍凍結後 1 日目は 735.1±360.6, 2 日目は 636.4±482.3, 3 日目は 732.0±608.5, 4 日目は 1,566.4±367.1 と正常ラットに比し有意 (p<0.01) の高値を示した。しかし、1 週目以降 15 週までは、いずれも軽度上昇を示すにとどまった (図 3)。

2) アミラーゼおよびアミラーゼアイソザイム

正常ラットの肝臓、膵臓、唾液腺および血漿中のアミラーゼアイソザイムを電気泳動法により検索したところ、9 本のバンドに分離され、臍由来のアミラーゼアイソザイムは陰極側より 1 番目と 2 番目のバンドに

存在した。

正常ラットの血漿中アミラーゼアイソザイム所見は、唾液腺にみられた所見と一致した。

正常ラットの血漿アミラーゼ値は 2,846±305 Somo-gyi u/dl であり、以後、著変を認めなかった。血漿中臍由来アミラーゼアイソザイムは、凍結処置後 1 日目より出現したが、1 週目以降は認められなかった (図 4)。

2. 臍の組織学的変化

凍結処置後の 1 日目における臍組織は、実質の壊死所見のみが著明であり、細胞浸潤や浮腫は認められなかった。2 日目から 3 日目にかけて、壊死周辺部に炎症細胞浸潤が起り、細臍管増生像が散見されるようになり、浮腫所見も認められた。処置後 4 日目になると、毛細血管、細臍管、細胞浸潤などはさらに増加傾向を示し、また、壊死周辺部にわずかながら線維増生像がみられるようになった。処置後 1 週目においては、線維化がさらに進行し、毛細血管、細胞浸潤および細臍管も著明に増加し、同時に壊死部の縮小傾向が認められた。その後、2~3 週にかけ、線維化はさらに進化した。また、残存壊死部はかなり縮少し、細臍管や細胞浸潤像の減少傾向が認められた。一方、この時期の終りには、組織中に脂肪組織がわずかに認められるようになった。4 週目に至ると、壊死部がわずかに残存し、線維組織もやや減少傾向を示すも、一方、脂肪組織の増加が明らかとなった。これに対し、毛細血管増

Table 1. Solutions for the gel columns of disc electrophoresis

Stock solution		Working solution	
(a) 1N KOH	48 ml	(I) Lower gel	
Acetic acid	21.27 ml	Lower gel A.....1 volume	
TEMED	4.6 ml	(a).....1 vol.	
Water to make	100 ml	(c).....2 vol.	
(b) 1N KOH	48 ml	Water ...1 vol.	
Acetic acid	2.944 ml	Lower gel B.....1 volume	
TEMED	0.46 ml	Ammonium persulfate 0.15 gr	
Water to make	100 ml	Water to make 100 ml	
(c) Acrylamide	30 gr	(II) Upper gel (pH 5.8)	
BIS	0.8 gr	(b).....1 vol.	
Water to make	100 ml	(d).....2 vol.	
(d) Acrylamide	10 gr	(e).....1 vol.	
BIS	2.5 gr	Water ...4 vol.	
Water to make	100 ml		
(e) Riboflavin	4 mg		
Water to make	100 ml		
(f) Buffer solution (pH 4.0)			
Acetic acid	2.28 ml		
Glycine	17.25 gr		
Water to make	1000 ml		

加や細胞浸潤の程度は軽度となっていた。凍結処置後5~15週にかけ、先の組織所見はさらに進行し、特に脂肪組織の占める割合が増加し、その後、同様の傾向が持続した。しかし、増加した毛細血管や細胞浸潤所見は、7週以降に認められなくなっていた。また、細尿管増生所見は、各週で認められたが、11週以降はわずかに散在するのみであり、線維組織は減少傾向が著明で、この時期以降は軽度に観察されるに過ぎなかった。一方、15週目においては、壊死部とその周辺の

部分の領域が脂肪組織に置換され、外分泌腺、ランゲルハンス氏島および細尿管がわずかに散在する終末像を呈していた(表2, 図5)。

3. 膵の乾湿重量の比率の推移

正常ラット膵における乾燥重量と湿重量の比率は、 $29.7 \pm 2.2\%$ (mean \pm S. D., $n=12$, 以下同じ) であ

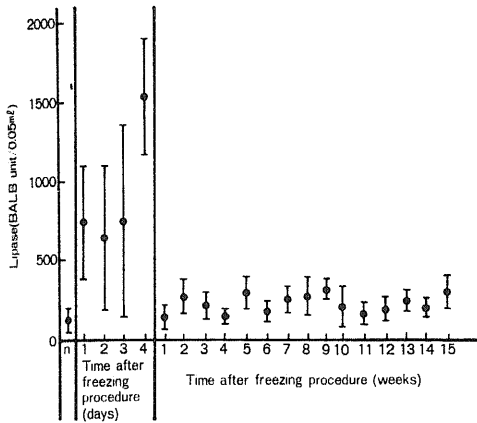


Fig. 3. Changes of plasma lipase levels after freezing procedure. Each point represents a mean \pm S. D. in 12 rats. n, control group.

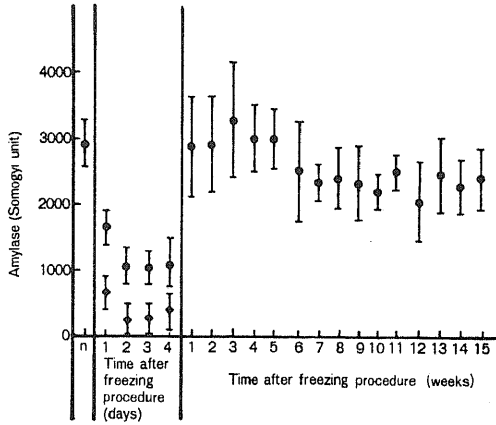


Fig. 4. Changes of plasma amylase levels after freezing procedure. Each point represents a mean \pm S. D. in 12 rats. n, control group; ●, total plasma amylase level; ◆, plasma amylase level originated from the pancreas.

Table 2. Histological changes of the pancreas after freezing procedure

Time after freezing procedure	Necrosis	Cellular infiltration	Capillary	Ductule	Fibrosis	Fat	
Days	1	##	-	-	-	-	
	2	##	+	-	+	-	
	3	##	##	+	+	-	
	4	##	##	+	+	-	
Weeks	1	##	##	##	##	+	
	2	##	##	##	##	+	
	3	+	+	##	##	##	
	4	+	+	##	##	##	
	5	+	+	##	##	##	
	6	+	+	##	##	##	
	7	-	-	-	-	-	##
	8	-	-	-	-	-	##
	9	-	-	-	-	-	##
	10	-	-	-	-	-	##
	11	-	-	-	-	-	##
	12	-	-	-	-	-	##
	13	-	-	-	-	-	##
	14	-	-	-	-	-	##
	15	-	-	-	-	-	##

- , negative ; + , mild ; ## , moderate ; ### , strong.

ったが、豚凍結後4週目では、 $38.4 \pm 6.3\%$ と正常ラットに比して有意 ($p < 0.01$) の高率を示した。また、4週目より9週目までは、この比率はほぼ横ばい状態であったが、10週目以降はさらに高率となり、15週目では $45.4 \pm 7.1\%$ となった (図6)。

4. 膵組織中ヒドロキシプロリン量の推移

膵組織中のヒドロキシプロリン量を測定するために、既知の標準資料の吸光度を測定して零点を通る標準曲線を得た (図7)。

上記の標準曲線より求めた乾燥重量 mg 当りのヒドロキシプロリン量をみると、正常膵組織では $3.38 \pm 0.85 \mu\text{g}/\text{mg}$ (mean \pm S. D., $n=12$, 以下同じ) であるが、豚凍結後1週目では $5.15 \pm 1.51 \mu\text{g}/\text{mg}$ と有意 ($p < 0.01$) に増加した。さらに、2週目の測定値は $7.55 \pm 1.32 \mu\text{g}/\text{mg}$ 、3週目は $7.59 \pm 1.48 \mu\text{g}/\text{mg}$ 、4

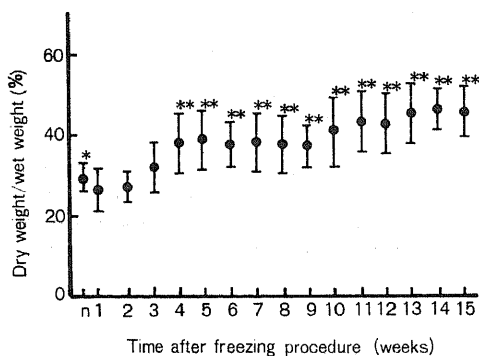


Fig. 6. Changing ratio of dry to wet weight of the pancreatic tissue after freezing procedure. Each point represents a mean \pm S. D. in 12 rats. n, control group; * - * *, ($p < 0.01$).

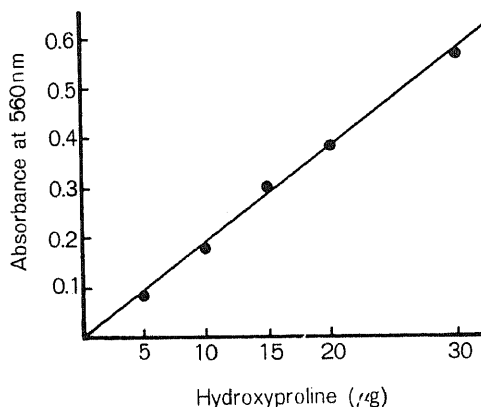


Fig. 7. Standard curve for hydroxyproline. (absorbance) = $0.02 \times$ (hydroxyproline).

週目は $7.89 \pm 1.61 \mu\text{g}/\text{mg}$ と著増した。しかし、5週目の値は $5.01 \pm 0.75 \mu\text{g}/\text{mg}$ と軽度増加にとどまり、以後10週目まで $5 \mu\text{g}/\text{mg}$ 台にとどまった。11~15週にかけての測定値は $4 \mu\text{g}/\text{mg}$ 台であり、正常群に比して有意差をみなかった (図8)。

5. 膵組織コラーゲナーゼ活性の推移

膵組織培養24時間目におけるコラーゲン基質の溶解輪形成は、正常群および処置後1週目群の膵では観察されなかった。しかし、2週目になると、2ラット16.7% ($n=12$) の膵に溶解輪がみられた。同様に、3週目は3ラット25%に、4週目は5ラット41.7%に溶解輪が

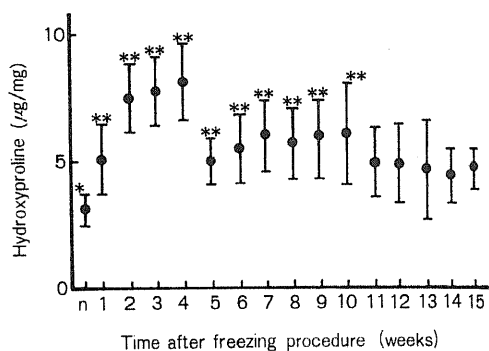


Fig. 8. Changes of hydroxyproline levels in the pancreas after freezing procedure. Each point represents a mean \pm S. D. in 12 rats. n, control group. * - * *, ($p < 0.01$).

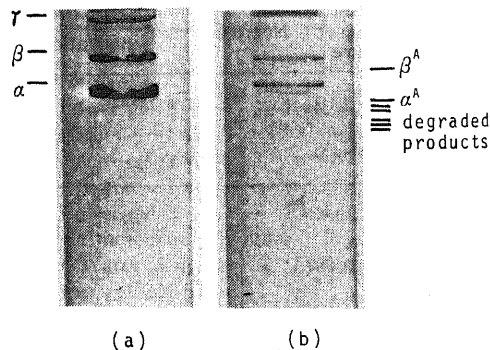


Fig. 10. Polyacrylamide gel disc electrophoresis patterns of themally denatured collagen. (a): Typical pattern of pure collagen extracted from the skins of wistar strain young rats is seen as α (monometric chain), β (dimetric chain) and γ (trimetric chain). (b): Pattern of collagen reaction mixtures degraded by collagenase in the pancreatic tissue at the 5th week after freezing procedure. Degraded products are seen as several new components below the original bands.

認められ、5週目には8ラット66.7%と最も高率となった。6週目には4ラット33.3%と低下し、7週目以降において溶解輪は観察されなかった(図9, 表3)。

一方、コラーゲナーゼ活性の程度は表3に示した如くであるが、腓凍結後5週目のラットにおいて活性は最も強く、(+++)および(++)の判定例の出現をみた。この溶解度(+++)は、別に検索した細菌性コラーゲナーゼ(Worthington, 4188, CLS IV, 40C151) 3 μg, 4時間培養における溶解度に相当した。

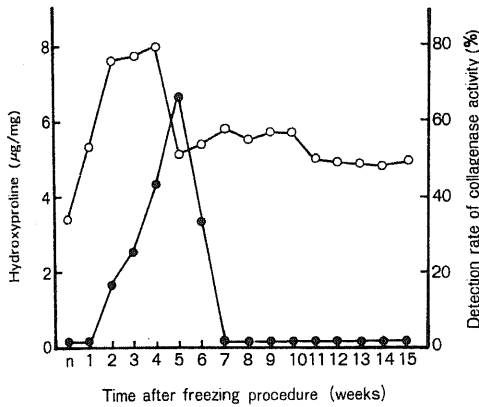


Fig. 11. Relationship between hydroxyproline levels and detection rate of collagenase activity in the pancreas after freezing procedure. Each point represents a mean ± S. D. in 12 rats. n, control group; ○—○, hydroxyproline levels; ●—●, detection rate of collagenase activity.

なお、再生コラーゲン線維は、エラスターゼ(elastase)、トリプシン(trypsin)、ペプシン(pepsin)、パパイン(papain)によっても溶解されなかった。

6. 中性可溶性コラーゲンおよびその反応生成物の検討

幼若ラットより抽出精製した中性可溶性コラーゲンの電気泳動像では、α, β, γに相当する基本的泳動所見¹⁷⁾が得られ、抽出コラーゲンが純粋であることを示した。一方、基質における溶解反応生成物の電気泳動像では、α^A, β^A等の泳動所見がみられたが、この所見は、既知の動物性コラーゲナーゼにより分解されたコラーゲンの泳動所見⁷⁹⁾と一致していた(図10)。

7. 膵組織中ヒドロキシプロリン量の推移とコラーゲナーゼ活性の推移との関係

膵組織中ヒドロキシプロリン量が腓凍結後2, 3, 4週と経過するにつれ増加するのに応じて、正常ラット膵で検出されなかったコラーゲナーゼ活性の検出率は次第に上昇し、4週目においては41.7%に認められた。4週から5週にかけて、ヒドロキシプロリン量は減少したが、逆にコラーゲナーゼ活性の認められたラットは66.7%と高率であった。以後の週においては、コラーゲナーゼ活性の検出率は急減した(図11)。

考 察

本邦における慢性膵炎の病因としての急性膵炎の頻度は全国集計で6.2%であり、佐藤ら²⁾は、開腹手術で確認した急性膵炎症例の追跡調査から、慢性膵炎へ移行した率が20%前後にみられたと報告している。この

Table 3. Changes of collagenase activity in the pancreas after freezing procedure

Time after procedure (weeks)	Number of rats	Grades of collagenase activity				
		(0)	(±)	(+)	(++)	(+++)
1	12	12	0	0	0	0
2	12	10	1	1	0	0
3	12	9	2	1	0	0
4	12	7	2	3	0	0
5	12	4	2	3	2	1
6	12	8	1	3	0	0
7	12	12	0	0	0	0
8	12	12	0	0	0	0
9	12	12	0	0	0	0
10	12	12	0	0	0	0
11	12	12	0	0	0	0
12	12	12	0	0	0	0
13	12	12	0	0	0	0
14	12	12	0	0	0	0
15	12	12	0	0	0	0

ように、殆ど急性肺炎は成因の如何にかかわらず治癒し、慢性化するものは一部の症例に限られると推察される。

一般に、慢性肺炎の組織学的特徴は肺の線維化¹⁹⁾²⁰⁾であるが、その発現部位や分布は種々²¹⁾であり、肺全域にわたって散在性に線維化が認められるものや、限局性のみ認められるものがある。この所見は、外分泌酵素の逸脱など特異な発症機構をもつ肺自体に原因を求める必要があることを示している。一方、それらを考慮して、種々の実験的肺炎モデルが作製²³⁾²⁴⁾されている。すなわち、林田ら^{24)~26)}は、実験的肺炎作製法を大別して、1.エチオン等薬剤投与による方法、2.肺管内薬物注入による方法、3.肺管結紮法、4.血管内異物注入による方法を挙げ、これらによる実験的肺炎では、肺管像に変化を及ぼすほどの肺の線維化を得ることが困難であると述べ、肺凍結による実験的肺炎モデルを作製した。著者は、肺の凍結処置後に起る肺壊死、著明な線維化、その後の線維吸収および脂肪組織置換などが短期間にみられることに着目し、この方法による実験的壊死性肺炎モデルをこの研究に用いた。林田らは、雑種成犬に肺凍結処置を施し、肺管の変化や線維化を中心に述べているが、著者の実験にみられた凍結処置後のラット肺組織変化は、肺の融解壊死で始まり、好中球等の細胞浸潤、血管増生といった急性肺炎像から、線維増生、細肺管増生、壊死部吸収および脂肪組織置換等の慢性肺炎像を呈した。一方、小塚ら²⁷⁾は、1,600剖検肺について、壊死性肺炎の病理組織学的研究を行い、1.急性壊死性肺炎、(A.融解壊死期、B.脂肪壊死巣残存期)、2.壊死性肺炎後遺症、3.反復性壊死性肺炎の3群に分類し、壊死性肺炎後遺症を広義の慢性壊死性肺炎とした。その組織学的特徴として、脂肪組織による肺実質の置換、小葉内巣状または小葉周囲瀰慢性線維化、細肺管集合など、多くを挙げた。また、林²⁸⁾は、肺の壊死巣が脂肪組織で吸収置換される所見は、壊死から瘢痕への一般概念が肺に当てはまらず、肺の臓器特異性によるものであると述べている。

著者の用いた肺凍結処置による実験的肺炎は、これらの報告にみられる肺炎所見の各病期と近似し、その経過を連続的にかつ短期間に観察できる利点を有していると推察された。

肺障害による肺酵素逸脱現象の変化は、血中や尿中の肺酵素の測定により、ある程度まで推定が可能である。肺逸脱酵素のうち、アミラーゼは、活性が安定なこと、生体内に活性阻害物質や類似酵素がないことから、肺疾患の診断および経過観察に重要である。ラットにおいては、肺、肝、唾液腺由来のアミラーゼアイソザイムが、各々、電気泳動で分離同定され、正常

時に血中に出現するアミラーゼは、ヒトの血中にみられる所見²⁹⁾と異なり全て唾液腺由来³⁰⁾とされている。著者の用いたタイタンIIIを支持体とする電気泳動およびブルースターチ寒天密着法による血漿中の肺由来アミラーゼは、肺凍結処置後1~4日目まで測定されたが、1週以後に全く検出されなかった。一方、リパーゼは種々の臓器に存在するが、肺リパーゼに特異的な基質を使用することにより、その測定は肺炎の診断に有用である³¹⁾³²⁾。ラット肺凍結処置後の血漿リパーゼ値は、4日目までは高値を示したが、その後は軽度上昇を示すにとどまった。従って、肺アミラーゼアイソザイムおよびリパーゼの測定値から、凍結処置により惹起される肺組織破壊は、1週目以後は酵素学的に鎮静化するものと推察された。

肺線維化の程度の表現として、日本肺臓病研究会²⁰⁾では、慢性肺炎を臨床的に軽度、中等度、高度に分けている。しかし、この表現は肺線維化の程度を定量的に示していないことから、小泉³³⁾は、投影機を用いて組織像をトレーシングペーパーに描き、線維部を切り抜いてその重量を測定することから線維化率を算出している。また、小関ら³⁴⁾は、441の交点を有する格子型接眼マイクロメーターを顕微鏡に装着して行う point counting method による線維化率を報告した。しかし、これらの方法をもってしても肺線維化を定量的に判定することは必ずしも容易でない。

ところで、組織中ハイドロキシプロリンは、コラーゲン蛋白に特有の構成アミノ酸であり、コラーゲンの全アミノ酸に対する比率がほぼ一定していることから、その測定は、膠原線維量の良い指標になると考えられている。実験的肺炎後の肺線維化の定量を、能登³⁵⁾は Prockop - Udenfriend 法³⁶⁾を用い、井上³⁷⁾は Neuman 法³⁸⁾を用いて、各々肺組織中ハイドロキシプロリン量を測定することから行っている。しかし、これらの方法は、測定範囲が狭く、操作が複雑で、かつ測定値に安定性を欠き、長期の習熟が要求される。著者の用いた KISO 法は、検索部位を一塊として容易に測定することが可能であり、また、その測定に安定性が認められることから、有益と思われた。

凍結処置後の肺組織中ハイドロキシプロリン量は、4週目まで急増し、5週目に低下し以後著変をみなかったが、この変化は組織像における線維化の推移とほぼ一致した所見であった。

組織中の水分含有量は、臓器によりほぼ一定³⁹⁾であるとされている。そこで、実験的肺炎の各時期における肺の組織中水分量を検索することから、肺の組織学的変化の推測を試みた。肺の湿重量に対する乾燥重量の比率は、正常肺ではほぼ30%であるが、凍結処置後1.

2週目には軽度低下を示した。この時期でもなお、組織浮腫のあることが推定された。しかし、4週目以降はその比率が有意に上昇し、15週目に至ると50%近くに達した。この乾重重量比率の上昇の原因は、腓実質細胞の減少や線維化以外に、3週目より出現し始めた脂肪組織が徐々に増加したための変化と推察される。

コラゲナーゼは、生理的条件下で極めて安定な三重螺旋構造を有するコラーゲンの一点に特異的に作用し、これを二分する性質を有していることから、コラーゲン線維の分解吸収に大きく関与する酵素⁴⁰⁾とされている。

かつては、コラーゲン線維を特異的に分解する酵素は *Clostridium histolyticum* 由来の細菌性コラゲナーゼのみとされていたが、1962年、Grossらはオタマジヤクシの尾部の皮膚を組織培養することにより、初めて中性領域の生理的条件下で酸可溶性牛皮膚コラーゲンを分解する動物性コラゲナーゼ活性を観察した。それ以後、動物性コラゲナーゼは創傷治癒時の皮膚⁶¹⁾、ヒトの皮膚⁴¹⁾、角膜⁶⁾、胃粘膜^{42)~44)}、癌組織⁴³⁾⁴⁵⁾⁴⁶⁾、あるいは他の組織^{9)47)~49)}において検出されている。

Cameronら⁵⁰⁾は四塩化炭素障害ラット肝において一度形成がみられた線維化も、ある条件下で分解吸収され、改善することを示した。一方、Okazakiら⁵¹⁾、Irmgardら⁵²⁾は、四塩化炭素障害ラット肝の線維崩壊消失の機序にコラゲナーゼが関与することを示し、可逆的な時期にその活性は認められるが、不可逆な時期に活性は認められなくなったと報告した。

ところで、腓コラゲナーゼに関する記述は散見される^{53)~58)}が、それらは Houckらの一連の研究^{56)~58)}を指していると思われる。Houckらは、腓抽出物により線維形成能が阻害され、大豆トリプシンインヒビターの存在下で塩可溶性コラーゲン溶液の粘度が低下したことを報告し、さらに彼らは、pH 8.6で腓から抽出することによりその活性物は精製可能であり、その活性はカルシウムの存在と無関係にpH 5.5で最大になると述べた。しかし、この研究に用いられた基質はコラーゲンの再生線維でなく、プロコラーゲンであること、また、プロコラーゲンにのみ作用し、天然コラーゲンには作用しないことなどから、報告された所見はコラゲナーゼによるのではなく、他の蛋白分解酵素による結果である可能性が高いと推察される。

コラゲナーゼ活性の検出法には、¹⁴Cや³Hで標識されたコラーゲンからの標識ペプチドの遊離を測定する方法^{5)59)~61)}、あるいは、コラーゲン溶液の粘度の低下を測定する方法⁵⁹⁾⁶²⁾など多くの方法が報告されている。著者は、Grossら⁵⁾の方法に準じて腓組織培養法により、コラゲナーゼ活性の検出を行った。腓にはトリプシン、

キモトリプシン、エラスターゼなどのエンドペプチダーゼやカルボキシペプチダーゼA、Bのような蛋白分解酵素が多く存在するが、著者の用いた基質はそれらの酵素を作用させても溶解されなかった。Grossらは酸可溶性コラーゲンを基質として用いたが、著者は、Kangら¹³⁾の方法に準じて抽出した中性可溶性コラーゲンをを用いることにより、一層生理的条件下でコラゲナーゼ活性を検出した。また、培養液であるタイロイド液に、ペニシリンGおよびストレプトマイシンを加えることにより、細菌の影響を除外した。

研究の進んだ現在においても、化学的に組成の明らかでない、いわゆる合成培地だけでは多くの細胞や組織を生育させることができないことから、培養液としては動物の血清を10%前後に合成培地に添加⁶³⁾したものをを用いるのが普通である。しかし、Grossら以降、各研究者が動物性コラゲナーゼ活性の検出に成功した要因は、血清無添加の培養液を使用した点にあると推察される。つまり、血清中には数種のコラゲナーゼ活性阻害物質、すなわち、 α_2 -マクログロブリン (α_2 -macroglobulin)^{64)~67)}、 β_1 -血清蛋白 (β_1 -serum protein)⁶⁸⁾⁶⁹⁾、 α_1 -アンチトリプシン (α_1 -antitrypsin)⁶⁶⁾⁶⁷⁾、血小板因子4 (platelet factor 4)⁷⁰⁾や陽イオン蛋白 (cationic proteins)⁷¹⁾などが存在することが判明している。著者は、腓凍結処置ラットの血漿を用いてコラゲナーゼ活性の検出を試みたが、再生コラーゲン線維に溶解輪形成を観察できなかった。

ところで、溶解輪形成がコラゲナーゼの作用であることを証明するためには、電気泳動または電子顕微鏡により、トロポコラーゲン (tropocollagen) がTC^AとTC^Bに二分されていることを示す必要がある⁶²⁾とされている。著者は、溶解産物についてポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動を用いることにより、Grossら⁶²⁾と同様のコラーゲン分解パターンを得たことより、再生コラーゲン線維の溶解は、コラゲナーゼによる反応であることを確認した。

凍結処置腓組織中のコラゲナーゼ活性の推移をみると、コラゲナーゼ活性は2週目より検出され、5週目でピークに達したが、7週目以降は検出されなかった。組織像と対比すると、2週目は線維が加速度的に増加し始めた時期であり、5週目は線維の分解吸収が著明となった時期である。また、7週目以降は腓炎が終末像を呈し、障害部の大半が脂肪組織に置換され、線維化がほぼ固定した時期である。従って、コラゲナーゼ活性は線維増生と密接な関係にあり、コラーゲン線維の分解吸収に重要な役割を果していることが推定される。ところで、白血球にもコラゲナーゼ活性が検出⁷²⁾されているが、凍結処置腓の組織像でみられる白血球浸

潤は1~2週が最盛期であること、および、白血球コラゲナーゼは血中の α_2 -マクログロブリンにより抑制されないことなどより、著者の検出したコラゲナーゼ活性は白血球由来ではないと思われる。むしろ、線維増生と密接な関係にあることから、線維芽細胞由来⁷³⁾⁷⁴⁾の可能性が推定される。

丸山⁷⁵⁾は、慢性四塩化炭素 (carbon tetrachloride) 障害ラット肝の線維化過程におけるコラゲナーゼ活性は、線維化の程度と平行してある程度増強するが、不可逆期にまで線維化が進行すると、もはやその活性の増強はみられず、逆に低下する所見を示した。この成績から、不可逆性線維症は、コラゲナーゼ活性の増強以上にコラーゲン形成の亢進があるために生ずるものであることが述べられている。

壊死巣は、一般に肉芽組織に置換され、終局的には瘢痕組織となる。しかし、臍においては壊死巣の大部分は脂肪組織で吸収置換されることが観察²⁸⁾されている。この事実は、肝などの他臓器にはみられない臍の特異性と言えよう。臍においては、コラゲナーゼにより二分されたコラーゲン線維は、体温で変性されることによりトリプシンやエラスターゼなど豊富に存在する非特異的蛋白分解酵素の作用¹⁸⁾をうけて容易に吸収されるものと推察される。従って、コラゲナーゼは、生理的条件下でコラーゲン線維を最初に分解する酵素となり、増生した線維の分解吸収にあたって不可欠な役割を担っていることが示唆される。

結 論

二酸化炭素使用の凍結装置を用いたラット臍を凍結処置し、実験的壊死性臍炎を作成することにより、臍の線維増生とその分解吸収過程を観察した。その際、組織培養法により臍組織中コラゲナーゼ活性を検出し、これと臍線維化の消長との関係を検討し以下の結果を得た。

1. 臍の凍結処置により、血漿中リパーゼおよびアミラーゼは、凍結処置後1週目まで高値を示した。
2. 臍の凍結処置により、まず臍実質の壊死がみられ、ついで、2~3週間にわたり細胞浸潤、毛細血管および臍管の増生がみられた。4日目頃から出現した線維化は、3~4週目頃をピークとし、以後減少するが、5週目以降には脂肪組織の増加が著明となった。
3. 臍組織の乾湿重量比率は、4週目以降に有意の増加を示したが、これは一旦増生した臍の線維化の減少、脂肪組織の増加と平行していた。
4. 膠原線維量の指標となる臍組織中ハイドロキシプロリン量は、凍結処置後1週目より4週目まで増加し、5週目以降は減少傾向を示した。

5. 幼若ラット皮膚より抽出した中性可溶性コラーゲンを基質とし、組織培養法により臍コラゲナーゼを検出した。また、本法により得られた基質の溶解産物は、ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動法により、動物性コラゲナーゼによるものであることが認められた。

6. 臍組織培養法により検出された臍コラゲナーゼ活性と臍組織中ハイドロキシプロリン量の推移との関係を見ると、ハイドロキシプロリンは、臍凍結後2, 3, 4週と増加するのに応じて、正常臍では検出されなかったコラゲナーゼ活性は次第に上昇し、ハイドロキシプロリンが減少し始める5週目ではコラゲナーゼは66.7%と最高値を示したが、7週目以降ではその活性をみなかった。

以上の成績より、実験的壊死性臍炎後の臍線維増減とコラゲナーゼが関連しており、両者の推移から臍コラゲナーゼは臍線維化に対して抑制的な役割を呈しているものと推察された。

(本論文の要旨は、第23回日本消化器病学会秋季大会、第11回創傷治癒研究会において発表した。)

稿を終るに臨み、御指導、御校閲を賜りました宮崎逸夫教授に深謝いたします。また、直接御指導、御助言を戴いた木南義男助教授、さらに病理学的検索に御指導を戴いた金沢大学第1病理中西功夫助教授に感謝の念を表します。

文 献

- 1) 佐藤寿雄：慢性臍炎調査研究班，昭和49年度研究業績1974。
- 2) 佐藤寿雄・斉藤洋一・白相光康・松野正紀・芳賀紀夫：急性臍炎経過後の病態について。特にその慢性化の問題を中心として。最新医学，27，1677-1687 (1972)。
- 3) 林浩次：シンポジウム第3集。急性臍炎の病態と治療(日本臍臓病研究会編)9-14頁，東京，医学図書出版，1978。
- 4) 堺隆宏：線維化と酵素系。コラゲナーゼ，肝胆臍，3，487-491 (1981)。
- 5) Gross, J. & Lapiere, C. M.: Collagenolytic activity in amphibian tissues. A tissue culture assay. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 48, 1014-1022 (1962)。
- 6) Grillo, H. C. & Gross, J.: Collagenolytic activity during mammalian wound repair. Dev. Biol., 15, 300-315 (1967)。
- 7) Jeffrey, J. J. & Gross, J.: Collagenase from rat uterus. Isolation and partial characterization. Biochemistry, 9, 268-273 (1970)。

- 8) Brown, S. I., Weller, C. A. & Wasserman, H. E.: Collagenolytic activity of alkali-burned corneas. *Arch. Ophthalmol.*, **81**, 370 - 373 (1969).
- 9) Nagai, Y. & Hori, H.: Vertebrate collagenase. Direct extraction from animal skin and human synovial membrane. *J. Biochem.*, **72**, 1147 - 1153 (1972).
- 10) 田嶋嘉雄: 実験動物学・各論 (田嶋編), 第5版, 453 - 455 頁, 東京, 朝倉書店, 1972.
- 11) Richards, C., Fitzgerald, P. J., Carol, B., Rosenstock, L. & Lipkin, L.: Segmental division of the rat pancreas for experimental procedures. *Lab. Invest.*, **13**, 1303 - 1321 (1964).
- 12) Inayama, S., Shibata, T. & Saito, S.: A new microanalytical method for determination of hydroxyproline in connective tissue. *Keio J. Med.*, **27**, 43 - 46 (1978).
- 13) Kang, A. H., Nagai, Y., Piez, K. A. & Gross, J.: Studies on the structure of collagen utilizing a collagenolytic enzyme from tadpole. *Biochemistry*, **5**, 509 - 515 (1966).
- 14) Riley, W. B., & Peacock, E. E.: Identification, distribution, and significance of a collagenolytic enzyme in human tissues. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **124**, 207 - 210 (1967).
- 15) Ornstein, L.: Disc electrophoresis - I. Background and theory. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 321 - 349 (1964).
- 16) Davis, B. J.: Disc electrophoresis - II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404 - 427 (1964).
- 17) Nagai, Y., Gross, J. & Piez, K. A.: Disc electrophoresis of collagen components. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 494 - 500 (1964).
- 18) Sakai, T. & Gross, J.: Some properties of the products of reaction of tadpole collagenase with collagen. *Biochemistry*, **6**, 518 - 528 (1967).
- 19) 小島國次・菅又宏: 病理学よりみた慢性膵炎. 診療, **23**, 1471 - 1481 (1970).
- 20) 日本膵臓病研究会: 慢性膵炎の臨床診断基準 (試案). 日消会誌, **68**, (1971).
- 21) 林活次: 膵線維化の病理. 肝胆膵, **3**, 563 - 568 (1981).
- 22) Shiller, W. R., Suriyapa, C. & Anderson, M. C.: Current research review. A review of experimental pancreatitis. *J. Surg. Res.*, **16**, 69 - 90 (1974).
- 23) Wanke, M.: Experimental acute pancreatitis, p 65 - 142. In *Current Topics in Pathology*, Springer - Verlag, Berlin, 1970.
- 24) 林田康男・権田厚文・横田広夫・山崎忠光・高田方凱・城所侑: 膵炎の実験モデル. 医学の歩み, **103**, 346 - 352 (1977).
- 25) 林田康男・権田厚文・舘部元道・山崎忠光・世良田進三郎・城所侑・高田方凱: 慢性膵炎 (内藤編). 内科 MOOK No. 6. 40 - 46 頁, 東京, 金原出版, 1979.
- 26) 林田康男・滝沢直樹・権田厚文・城所侑: 膵の形態と機能 (橋本編), 第1版, 223 - 232 頁, 東京, 宇宙堂八木書店, 1981.
- 27) 小塚貞雄・坪根幹夫・滝正: 壊死性膵炎の病理組織学的研究. 胆と膵, **2**, 577 - 585 (1981).
- 28) 林活次: 知られざる臓器“膵”, 膵臓の病理 (エーザイ編), 5 - 12 頁, 東京, エーザイ, 1975.
- 29) 小川道雄: アミラーゼ. 消化管外科, **3**, 1115 - 1123 (1980).
- 30) Takeuchi, T., Mura, M., Sakaki, R., Matsushima, T. & Sugimara, T.: Comparative studies on electrophoretic mobility and immunogenicity of pancreatic and parotid amylases of rat. *Biochem. Biophys. Acta*, **403**, 456 - 460 (1975).
- 31) 阿部裕・七里元亮・菊池幹雄: リパーゼ. 消化器外科, **3**, 1125 - 1131 (1980).
- 32) 北村次男・黒岡繁: ヒト血清リパーゼの膵疾患診断指標としての意義. 医学のあゆみ, **109**, 587 - 598 (1979).
- 33) 小泉金次郎: 膵機能と病理組織所見. 日本膵臓病研究会プロシーディングス, **2**, 109 (1972).
- 34) 小関栴・能登陸・松野正紀・狩野研次郎: 慢性膵炎の組織像と臨床像との対比: とくに組織計測学的立場から. 日消会誌, **77**, 954 - 962 (1980).
- 35) 能登陸: 膵炎の修復過程に及ぼす食飼の影響: ラットについての実験的研究. 日消会誌, 869 - 877 (1972).
- 36) Prockop, D. J. & Udenfriend, S.: A specific method for the analysis of hydroxyproline in tissues and urine. *Anal. Biochem.*, **1**, 228 - 239 (1960).
- 37) 井上吉弘: 膵線維化の機序に関する実験的研究: 特に膵組織ハイドロキシプロリン量と膵線維化. 日消外会誌, **13**, 1369 - 1378 (1980).
- 38) Neuman, R. E. & Logan, M. A.: The determination of hydroxyproline. *J. Biol. Chem.*, **184**, 299 - 306 (1950).
- 39) 柴田徹一・稲山誠一・中村薫・中里由利子・細田泰弘: 凍結乾燥法を用いる微量臓器中の水分ならびに肺結合組織中コラーゲンの微量定量法. 医学のあゆみ,

- 113, 413 - 415 (1980).
- 40) Harper, E. : Collagenase. *Ann. Rev. Biochem.*, **49**, 1063 - 1078 (1980).
- 41) Eisen, A. Z., Jefferey, J. J. & Gross, J. : Human skin collagenase. Isolation and mechanism of attack on the collagen molecule. *Biochem. Biophys. Acta*, **151**, 637 - 645 (1968).
- 42) Woolley, D. E., Tucker, J. S., Green, G. & Evanson, J. M. : A neutral collagenase from human gastric mucosa. *Biochem. J.*, **153**, 119 - 126 (1976).
- 43) 本谷益良 : ヒトの正常胃, 胃潰瘍, 胃癌におけるコラゲナーゼ活性. *医学と生物学*, **80**, 273 - 275 (1970).
- 44) 本谷益良・宇宿源太郎 : ヒト胃炎コラゲナーゼの組織学的性質. *医学と生物学*, **80**, 277 - 280 (1970).
- 45) Dresden, M. H., Heilman, S. H. & Schmidt, J. D. : Collagenolytic enzymes in human neoplasms. *Cancer Res.*, **32**, 993 - 996 (1972).
- 46) Harris, E. D., Faulkner, C. S. & Wood, S. : Collagenase in carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **48**, 1247 - 1253 (1972).
- 47) Fullmer, H. M. & Gibson, W. : Collagenolytic activity in gingivae of man. *Nature*, **209**, 728 - 729 (1966).
- 48) Beutner, E. H., Triftshauser, C. & Hasen, S. P. : Collagenolytic activity of gingival tissue from patients with periodontal diseases. *Pro. Soc. Exp. Biol. Med.*, **121**, 1082 - 1085 (1966).
- 49) Harris, E. D., DiBona, D. R. & Krane, S. M. : Collagenase in human synovial fluid. *J. Clin. Invest.*, **48**, 2104 - 2113 (1969).
- 50) Cameron, G. R. & Karunaratne, W. A. E. : Carbon tetrachloride cirrhosis in relation to liver regeneration. *J. Path. Bact.*, **42**, 1 - 21 (1936).
- 51) Okazaki, I. & Maruyama, K. : Collagenase activity in experimental hepatic fibrosis. *Nature*, **252**, 49 - 50 (1974).
- 52) Irmgard, M. & Ruy, P. T. : Collagenase in experimental carbon tetrachloride cirrhosis of the liver. *Am. J. Path.*, **92**, 411 - 417 (1978).
- 53) Forell, M. M., Stahlheber, H. & Lehnert, P. : Physiologie des exokrinen Pankreas, p 77 - 78. In Schwiegk, H. (ed.), *Handbuch der inneren Medizin*, 5te Auflage, Springer - Verlag, Berlin, 1976.
- 54) 早川哲夫・野田愛司・近藤孝晴 : 膵液の生化学. *胆と膵*, **1**, 1019 - 1030 (1980).
- 55) 織田敏次・笹本和啓 : 酵素診断法—誘発試験を含む—. **105 - 116** 頁, 内科シリーズ No. 29. 膵炎のすべ
- て (石井編), 東京, 南江堂, 1978.
- 56) Houck, J. C. & Patel, Y. M. : pancreatic collagenase. A new enzyme. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **102**, 421 - 423 (1959).
- 57) Houck, J. C. & Patel, Y. M. : The collagenolytic activity of pancreas. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **93**, 333 - 349 (1962).
- 58) Houck, J. C. & Patel, Y. M. : Collagenolytic activity of mammalian pancreas. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **116**, 382 - 385 (1964).
- 59) Nagai, Y., Lapiere, C. M. & Gross, J. : Tadpole collagenase. Preparation and purification. *Biochemistry*, **5**, 3123 - 3130 (1966).
- 60) Gisslow, M. T. & McBride, B. C. : A rapid sensitive collagenase assay. *Anal. Biochem.*, **68**, 70 - 78 (1975).
- 61) Kingsley, R. L., Irvin, E. L. & Paul, A. H. : A sensitive assay for collagenolytic activity using tritiated collagen. *Anal. Biochem.*, **70**, 218 - 223 (1976).
- 62) Gross, J. & Nagai, Y. : Specific degradation of the collagen molecule by tadpole collagenolytic enzyme. *Biochemistry*, **54**, 1197 - 1204 (1965).
- 63) 山根績 : 組織培養, 基本と実際 (堀田・大山編), 33 - 46 頁, 東京, 永井書店, 1976.
- 64) Werb, Z., Burleigh, M. C., Barrett, A. J. & Starkey, P. M. : The interaction of α_2 -macroglobulin with proteinases. Binding and inhibition of mammalian collagenases and other metal proteinases. *Biochem. J.*, **139**, 359 - 368 (1974).
- 65) Barrett, A. J. & Starkey, P. M. : The interaction of α_2 -macroglobulin with proteinases. Characteristics and specificity of the reaction, and a hypothesis concerning its molecular mechanism. *Biochem. J.*, **133**, 709 - 724 (1973).
- 66) Ohlsson, K. : α_1 -antitrypsin and α_2 -macroglobulin. Interactions with human neutrophil collagenase and elastase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **254**, 409 - 416 (1976).
- 67) Eizen, A. Z., Bloch, K. J. & Sakai, T. : Inhibition of human skin collagenase by human serum. *J. Lab. Clin. Med.*, **75**, 258 - 263 (1970).
- 68) Woolley, D. E., Roberts, D. R. & Evanson, J. M. : Inhibition of human collagenase activity by a small molecular weight serum protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **66**, 747 - 754 (1975).
- 69) Woolley, D. E., Roberts, D. R. & Evanson, J.

M. : Small molecular weight β_1 -serum protein which specifically inhibits human collagenase. *Nature*, **261**, 325 - 327 (1976).

70) Hiti - Harper, J., Wohl, H. & Harper, E. : Platelet factor 4 : An inhibitor of collagenase. *Science*, **199**, 991 - 992 (1978).

71) Kuettner, K. E., Hiti - Harper, J. Eisenstein, R. & Harper, E. : Collagenase inhibition by cationic proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **72**, 40 - 46 (1976).

72) Lazarus, G. S., Daniels, J. R., Brown, R. S., Bladen, H. A. & Fullmer, H. M. : Degradation of

collagen by a human granulocyte collagenolytic system. *J. Clin. Invest.*, **47**, 2622 - 2629 (1968).

73) 岡崎勲・丸山勝也・大塩力・土屋雅春 : 消化器疾患における collagenase の意義. *日消会誌*, **73**, 1 - 12 (1976).

74) Stricklin, G. P., Bauer, E. A., Jeffrey, J. J. & Eisen, A. Z. : Human skin collagenase : Isolation of precursor and active forms both fibroblast and organ cultures. *Biochemistry*, **16**, 1607 - 1615 (1977).

75) 丸山勝也 : 実験的肝線維症における肝 collagenase の証明とその活性の推移. *日消会誌*, **72**, 961 - 973 (1975).

A Study on Pancreatic Fibrosis and Collagenase Activity in Experimental Necrotizing Pancreatitis Michiaki Takata, Department of Surgery (II) (Director: Prof. I. Miyazaki), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 — J. Juzen Med. Soc., **91**, 473—488 (1982)

Abstract

This study was designed to elucidate the fibrous proliferation and adipose replacement in pancreas which were produced after acute pancreatitis, particularly of necrotizing type. Using male wistar rats, necrotizing pancreatitis was produced by a freezing procedure in the splenic segment of the pancreas. Examinations were made on histological changes, hydroxyproline levels measured by the KISO method, and collagenase activity determined by the tissue culture method using neutral soluble collagen as substrate. The freezing of the pancreas produced a necrosis and fibrous proliferation at the early stage which was replaced by an adipose tissue later. The hydroxyproline level increased gradually reaching the maximal value in four weeks after the freezing procedure, and decreased thereafter. The increased collagenase activity was observed in the 2nd week. The ratio of rats that showed collagenase activity and the level of its activity reached a maximum at the 5th week. The lysed products of substrates were indentified as those caused by collagenase, by the use of polyacrylamide gel disc electrophoresis. The results indicate that the increased collagenase activity in the pancreas is associated with fibrous proliferation in necrotizing pancreatitis. It is suggested that collagenase plays an important role in degradation and absorption of proliferated collagen fibers.

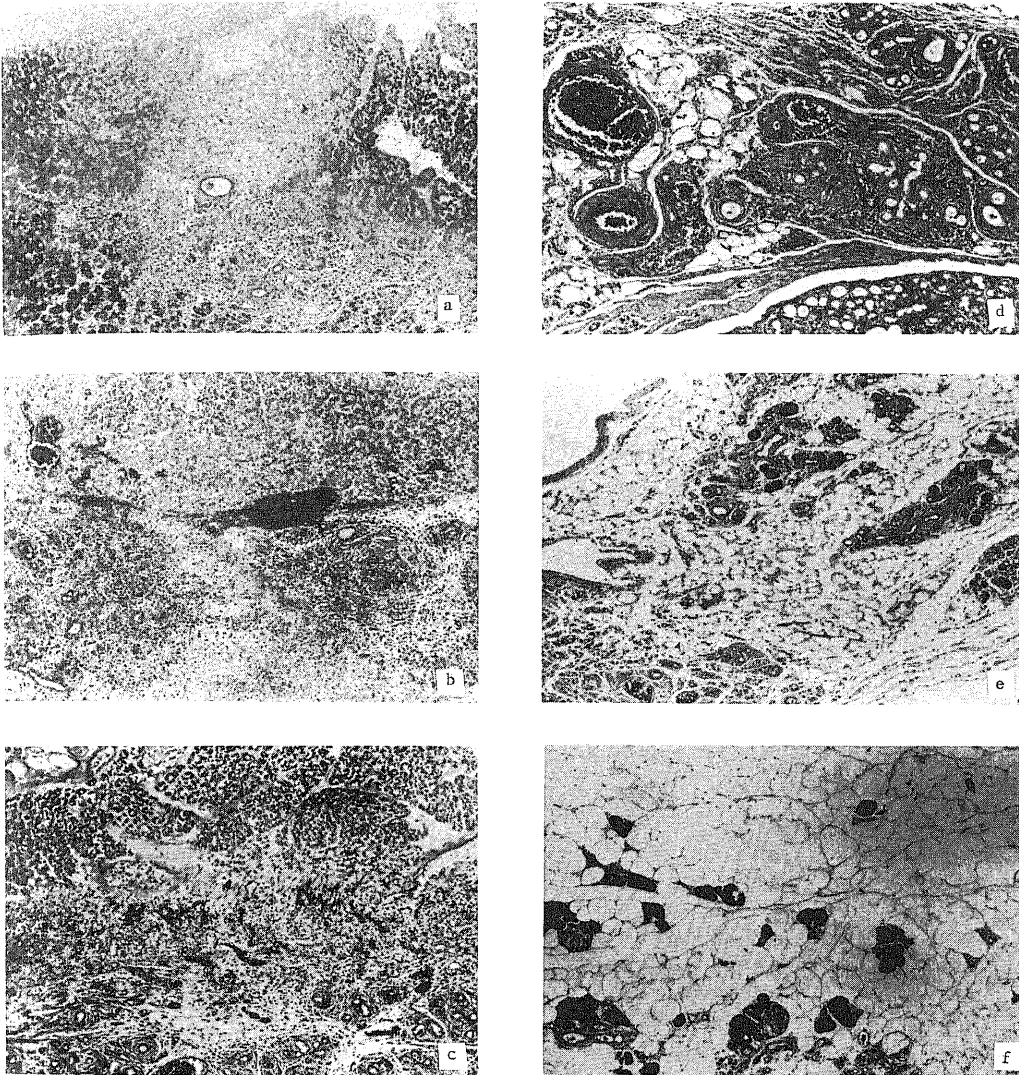


Fig. 5. Histological findings of the pancreas after freezing procedure. (hematoxyline - eosin stain, x 40).

- a: 3rd day, moderate cellular infiltration and mild ductule proliferation were seen around the necrosis.
- b: 4th day, mild proliferation of capillary and fibers were seen around the necrosis.
- c: 1st week, cellular infiltration and proliferation of capillary and ductule were seen moderately around the necrosis.
- d: 4th week, strong fibrosis was seen and mild adipose tissue appeared, but necrosis, cellular infiltration and capillary proliferation were reduced.
- f: 13th week, the most part of the damaged area was replaced by adipose tissue.

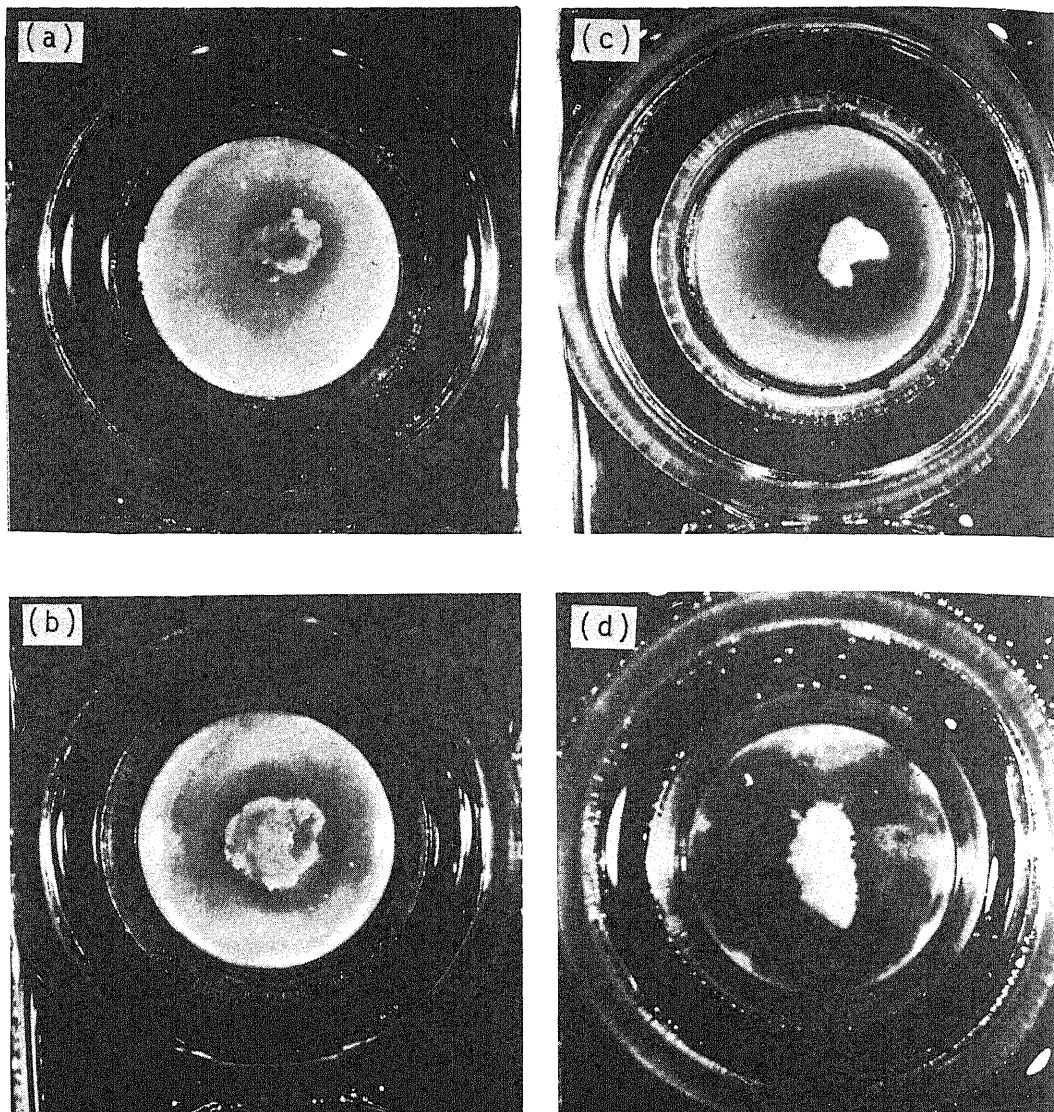


Fig. 9. Visible lysis of collagen gel in 24 hours cultures of pancreatic tissue at the 5th week after freezing procedure. Lysis is seen as transparent area around the pancreatic tissue. Non-lysed collagen gel substrate is seen as opaque area within the inner ring (15 mm I. D. and 2 mm deep). (a), collagenase activity (\pm); (b), collagenase activity (+); (c), collagenase activity (++) ; (d), collagenase activity (+++).