

カラギニン肉芽腫におけるコラーゲン分解に関する研究

〔Ⅱ〕in vitro におけるコラーゲンとカラギニンの相互作用

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）

第一報において著者はカラギニン肉芽腫に特異な横紋バタンを示すコラーゲン線維が見出されることを述べ、そのうちSLS及びFLSに類似した線維は以前考えられたようにコラーゲン分解を表わしているものではなく、別の形成機序をもつものであるであろうということを示唆した。本研究はこれらのSLS及びFLS様線維の形成機序を明らかにするために計画されたものである。

in vitro の再成コラーゲン線維のバタンはコンドロイチン硫酸、その他のポリアニオンによって影響をうけることが知られている¹⁾²⁾。カラギニンは多数の硫酸基を有するポリアニオンであるから、カラギニン肉芽腫において注射されたカラギニンと生体内のコラーゲン分子とが反応して特異な線維が形成される可能性が考えられる。この点を明らかにするため、カラギニンが in vitro のコラーゲン線維の形成に与える影響を検討した。

材料及び方法

I コラーゲン溶液.

コラーゲンは Rubin らの方法³⁾によりコウジ真皮から抽出、精製した。ただし抽出にはpH4.2の sodium-citrate buffer を用いた。

Rubin らの2A分画に相当する酸抽出分画を0.05%の酢酸に溶解し、大量の同じ酢酸に対して透析したものを凍結乾燥し、-20°Cで保存した。日立アミノ酸自動分析機によるこの分画のアミノ酸組成は表1に示す如くである。 $[\alpha]_D^{20}$ は-32°であった。

凍結乾燥したコラーゲンを0.05%の酢酸又はpH7.4、I 0.14又はI 0.4の phosphate buffer に溶解し、100,000g、1時間遠心して得た上清をコラーゲン溶液として用いた。イオン強度はNaClにより調節した。コラーゲン濃度は Kivirikko らの方法⁴⁾により定量したヒドロキシプロリン含量に7.5をかけて算出した。

II カラギニン.

カラギニンは少なくとも2種のガラクトースポリマーから成り、0.15MKClの添加により室温でゲル状に沈澱する成分はκ-カラギニン、溶液中に残る成分はλ-カラギニンと呼ばれる⁵⁾。肉芽腫の形成にはλ-カラギニンが主要な役割を果しているといわれる⁶⁾。本実験に使用したカラギニン (Marine colloids 社、

表1 Amino Acid Composition of Collagen used

Amino Acid	
Lysine	23.3
Histidine	2.3
Arginine	25.2
Hydroxyproline	146.0
Aspartic acid	41.3
Threonine	15.2
Serine	32.7
Glutamic acid	66.0
Proline	166.0
Glycine	336.0
Alanine	85.4
Valine	22.6
Isoleucine	11.5
Leucine	18.7
Phenylalanine	8.5
Total	1000.7
Glucosamine & Galactosamine	trace

expressed as moles/1000 residues recovered from the column.

Studies on collagenolysis in carrageenin granuloma II. Interactions between collagen and carrageenin in vitro. **Katsuhiko Kondo**, Department of Pathology (I) (Director : Prof. K. Kajikawa) School of Medicine Kanazawa University

Viscarine 402)は0.15MKCl添加により沈澱を生じないので、λ-カラギニン含量は少ないものと思われる。Dewar らの方法⁷⁾に従ってガラクトース定量を行なったところ、使用したカラギニンは37.6% (w/w) のガラクトースを含み、Lowry らの方法⁸⁾によるタンパク定量では1.2% (w/w) のタンパクを含むことが確かめられた。Dische らの方法⁹⁾により定量したガラクトース量に2.7をかけて溶液中のカラギニン量とした。

Ⅲ コラーゲンとカラギニンの相互作用

1. 酸性溶液中における実験：0.05%の酢酸に、0.01~0.1%の割合に溶かしたカラギニン溶液を同じ酢酸に溶かした0.2~0.5%のコラーゲン溶液に加えた。0~4℃においてこの混合液中に直ちに白色、線維状の沈澱が生ずる。沈澱量の代表的な値を表2に示す。

この混合液を30,000g, 30分又は100,000g, 1時間遠心し、その上清及び沈澱を電顕的に観察した。さらにこの沈澱及び上清を4℃で大量の生食水又は再蒸留水に対して5~21日間透析した後、再び電顕的に観察した。上清の一部をとってカラギニン及びコラーゲンの含有量を上述の方法で定量し、これらの値から沈澱したカラギニン及びコラーゲン量を算出した。

試料の一部をメッシュに載せ、1%PTA (pH7.3) によるネガティブ染色又は酢酸ウラニール、PTAの重染色を施した。使用電顕は日本電子JEM-7型、直接倍率は10,000~20,000で撮影した。

2. 中性溶液中における実験：4℃で phosphate buffer (pH7.4, I 0.14又はI 0.4) に約0.1%になるようにコラーゲンを溶かし、内じ buffer に溶かした0.001~0.5%のカラギニンを加え、この混合液を water bath で37℃及び25℃に加温しその際生ずる濁度の変化を Mathews らの方法¹⁰⁾に従って測定した。

結 果

I 酸性溶液中における所見

カラギニン溶液をコラーゲンに加えると直ちに生ずる白い線維状の沈澱はカラギニンとコラーゲンの比が約1:40 (w/w) においても生ずる。

100,000g, 1時間遠心して得た上清は透明であったが、30,000g, 30分間の遠心では上清中に僅かに白い沈澱が残った。

上清及び沈澱中のコラーゲン及びカラギニンの含量を表2に示す。電顕的观察によると上清、沈澱共に横紋のない直径約100 Åの細線維が含まれている。沈澱においてはこの細線維はシート状に凝集している。上清においては細線維の数ははるかに少なく、散在性に認められるにすぎない。

沈澱を0.05%酢酸で3回洗い、又上清はそのまま再蒸留水に透析してもこの所見は変らなかった。

Jackson ら²⁾はコラーゲン溶液とコンドロイチン硫酸の混合液のpHを酢酸ナトリウムの同時添加によって上昇させ、水道水に対して透析するとFLS線維が生ずることを報告している。そこでNaOHを加えて混合液の最終pHを5.6~6.0に調整した後再蒸留水又は水道水に対し、4℃又は室温で透析したが、横紋を有する線維は形成されなかった。

一方100,000g, 1時間遠心して得た沈澱を大量の生食水に5~21日以上透析すると、"native type"のコラーゲン線維及びセグメント状の構造物が形成された。30,000g, 30分遠心して得た沈澱について同様な操作を行なったところ多数の横紋のない細線維とセグメント状構造物のみが生じた。

100,000g, 1時間の遠心によって得た上清を生食水に透析すると、ほとんどすべて "native type"のコラーゲン線維のみが生じたが、30,000g, 30分遠心して得た上清には上述のセグメント状構造物が極めて少数混在していた。

表2 Precipitation of Collagen by Carrageenin at pH 3.7, 4℃

Carrageenin(mg (μ g/ml)	Sedimented carrageenin(%)	Sedimented collagen (%)	
		at 30,000g for 30 min.	at 100,000g for 1 hr.
80	90	13	20
160	95	24	32

Collagen concentration: 3.5mg/ml

いずれの場合もセグメント状構造物は巾200~400 Å, 長さ3000~3200 Åで, ネガティブ染色では, 長軸方向に走る直径約20~40 Åの細いフィラメントから成り, 多数の横紋を有する. これらの横紋のうちセグメントの両端からそれぞれ290及び260 Åの距離にある2本が最も明瞭にみえる. 酢酸ウラニールとPTAによるポジティブ染色を施すと, この横紋は明らかに非対称性の配列をとっていることが分かる(図1). 横紋の非対称性はデンストメーター曲線からも確認された(図3).

以上の超微構造的特徴からこのセグメント状構造体はSLSと同定される.

SLS線維はしばしば長軸方向に2個又はそれ以上連らなって多量体を形成する. 2量体の長さは約6200 Åで, B-B300 Åの重なり合いを有するもの(図2), A-B300 Åの重なり合いを有するもの, あるいは, ほとんど重なり合いがなしに, 端と端が結合しているものが認められた.

さらに上述の生食水に対する沈澱の透析を2~3週間つづけると, SLS線維にまじって, 少数ではあるが, 2つの型のFLS線維が形成される. 1つの型は3200~3400 Åの周期性横紋を有し(図4), 他は2500~2600 Åの周期で並ぶ一対の横紋が特徴的である(図5). 前者は Highberger ら¹¹⁾のFLS I型, 後者は Randall ら¹²⁾のFLS II型に相当すると思われる.

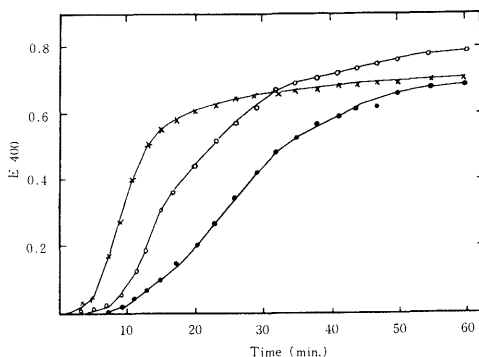
II 中性溶液における所見

1. pH7.4, I 0.14又はI 0.4, 4°Cの条件下ではコラーゲンとカラギニンを混合しても, 何ら沈澱を生じなかった.

2. コラーゲンの中性塩溶液を37°Cに温めると "native type" のコラーゲン線維が沈澱し, この沈澱形成に伴う濁度の変化を時間に対してプロットすると通常S字形の曲線が得られることが知られている¹³⁾. Wood ら¹⁴⁾によれば lag phase は核の形成期であり, その後に続く growth phase においてこの核にコラーゲン分子が付加して線維が形成されるといわれる.

本研究ではカラギニンとコラーゲンの混合液を37°Cに加温した場合には線維形成の速度が早く, カラギニンの影響は定量できなかった. そこで25°C, I 0.4で行なったところ, 通常のS字形曲線が得られた(図6). 添加するカラギニンの濃度の影響をみると, 低濃度で growth phase 及び lag phase の両方に変化が認められた. すなわち growth rate は減少し, lag phase は延長した. 80 µg/ml のカラギニン添加では lag time は10分, 160 µg/ml 添加では15分であった. 対照として緩衝液のみを加えたもので

図6 Effect of Carrageenin on the Rate of Collagen Fibril Formation at 25°C, I 0.4.



Collagen concentration: 1mg/ml
Carrageenin concentration in the incubation medium (µg/ml): 160
0: 80 x: control

は5分であった. なお lag time は incubation の開始から沈澱速度が最高になり始める間の時間とした.

以上の沈澱を電顕的に観察すると "native type" のコラーゲン線維と横紋のない細線維のみから成り, SLSやFLSは認めなかった.

考 察

本研究では, in vitro でカラギニンとコラーゲンを反応させると直径100 Å以下の細線維からなる沈澱を生じ, この沈澱を生食水に対して長時間透析することによりSLS及びFLS線維が形成されることが証明された. この成績はカラギニン肉芽腫にみられたSLS及びFLS様の線維は, コラーゲン線維の分解を表わしているのではなく, 注射されたカラギニンと生体内コラーゲンとの相互作用の結果生じた線維であることを強く示唆している.

従来報告ではSLSはアデノシン3リン酸(ATP)をコラーゲンの稀酢酸溶液に加えるか, あるいはDNA, ヘパリン又はコンドロイチン硫酸をコラーゲンの中性溶液に加え, ついで酸性緩衝液(pH3~5)に透析することによって形成されることが知られている¹⁵⁾¹⁶⁾. 本研究では中性メジウムではカラギニンはコラーゲンの線維形成速度に影響を与えるだけで, 長周期線維は形成されないことが示された. この成績から判断すると, もし生体内でカラギニンによって長周期線維が形

成されるとすれば、少なくとも局所的に酸性メジウムがつくり出されることが必要であろうと思われる。

カラギニンとコラーゲンによって生じたSLS多量体にはA-B300Å、B-B300Åの重なり合いを有するもの、及び重なり合いのない端-端結合を示すものがみられた。B-B300Åの重なり合いを有するSLS多量体はコラーゲン溶液にATPを加えることによって形成される通常のSLS多量体の形態と異なっている¹⁷⁾。Olsen¹⁸⁾は vitrosin をトリプシン処理後、ATPを加えるとさらに異常な重なり合いをもつ幾種類かのSLS多量体が形成されることを観察し、この現象は vitrosin に含まれる炭水化物の作用によるものではないかと述べている。本研究においても示されたように、これらの異常な重なり合いを有するSLS多量体の形成はコラーゲン分子-カラギニン複合体の特徴的現象かもしれない。

結 論

酸性溶液中で、コラーゲン溶液にカラギニンを添加すると直径100Å以下の細線維から成る沈澱を生じこの沈澱を大量の生食水に対して長時間透析することによって、SLS及びFLS線維が形成された。中性溶液中では“native type”のコラーゲン線維のみが形成された。このデータはカラギニン肉芽腫中に見出されるSLSやFLSが注射されたカラギニンと新生コラーゲンの相互作用によって形成されるという見解を支持するものである。

文 献

- 1) Fauré-Fremiet, E. : C. R. Soc. Biol. Paris, **113**, 715 (1933).
- 2) Jackson, S. F. & Randall, J. T. : Nature and Structure of Collagen, ed. by Randall, J. T., p. 181, London, Butterworth, (1953).
- 3) Rubin, A., Drake, M., Davison, P., Pfahl, D., Speakman, P. & Schmitt, F. O. : Biochemistry, **4**, 181 (1965).
- 4) Kivirikko, K. I., & Prockop, D. J. : Anal. Biochem., **19**, 249 (1967).
- 5) Smith, D. B. & Cook, W. H. : Arch. Biochem. Biophys., **45**, 232 (1953).
- 6) McCandless, E. L. & Lehoczy-Mona, J. : Growth, **28**, 143 (1964).
- 7) Dewar, E. T. & Percival, E. G. V. : J. Chem. Soc., **16**, 22 (1947).
- 8) Lowry, O. H., Rosebrough, V. J., Farr, A.

L. & Randall, R. T. : J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951).

9) Dische, Z., Shettles, L. B. & Osnos, M. : Arch. Biochem. **22**, 169 (1949).

10) Mathews, M. B. & Decker, L. : Biochem. J., **109**, 517 (1968).

11) Highberger, J. H., Gross, J. & Schmitt, F. O. : Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **37**, 286 (1951).

12) Randall, J. T., Brown, G. L., Jackson, S. F., Kelly, F. C., North, A. C., Seeds, W. E. & Wilkinson, G. R. : Nature and Structure of Collagen, ed. by Randall, J. T., p. 213, London, Butterworth, (1953).

13) Gross, J. & Kirk, D. : J. Biol. Chem., **233**, 355 (1958).

14) Wood, G. C. & Keech, M. K. : Biochem. J., **75**, 588 (1960).

15) Gross, J. : J. Biophys. Biochem. Cytol., Suppl., **2**, 261 (1956).

16) Kühn, K. & Zimmer, E. : Z. Naturforsch., **16b**, 648 (1961).

17) Hodge, A. J., Highberger, J. H., Deffner, G. G. J. & Schmitt F. O. : Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **46**, 197 (1959).

18) Olsen, B. R. : J. Ultrastuct. Res., **13**, 172 (1965).

図 の 説 明

図1. カラギニン(0.01%)添加によって形成されたSLS線維(長さ約2800Å)。矢印はコラーゲン分子の方向を示す。

ウラニール・PTA染色。×400,000

図2. 図1と同様な操作によって形成されたSLS多量体。B-B300Åの重なり合いに注意。矢印は分子の方向を示す。

ウラニール・PTA染色。×200,000

図4. コラーゲン溶液にカラギニンを添加することによって生じたFLS I型線維。

ウラニール・PTA染色。×54,000

図5. コラーゲン溶液にカラギニンを添加することによって形成されたFLS II型線維。

ウラニール・PTA染色。×72,000

A b s t r a c t

This study was meant to demonstrate that SLS and FLS were formed from collagen solution by addition of carrageenin 0.01 percent in acidic medium followed by prolonged dialysis against physiological saline. In neutral medium only the native type of collagen was formed. The data obtained supported the view that SLS and FLS found in carrageenin granuloma, as described in the previous paper, might be attributed to interactions of injected carrageenin and newly formed collagen in the granuloma.

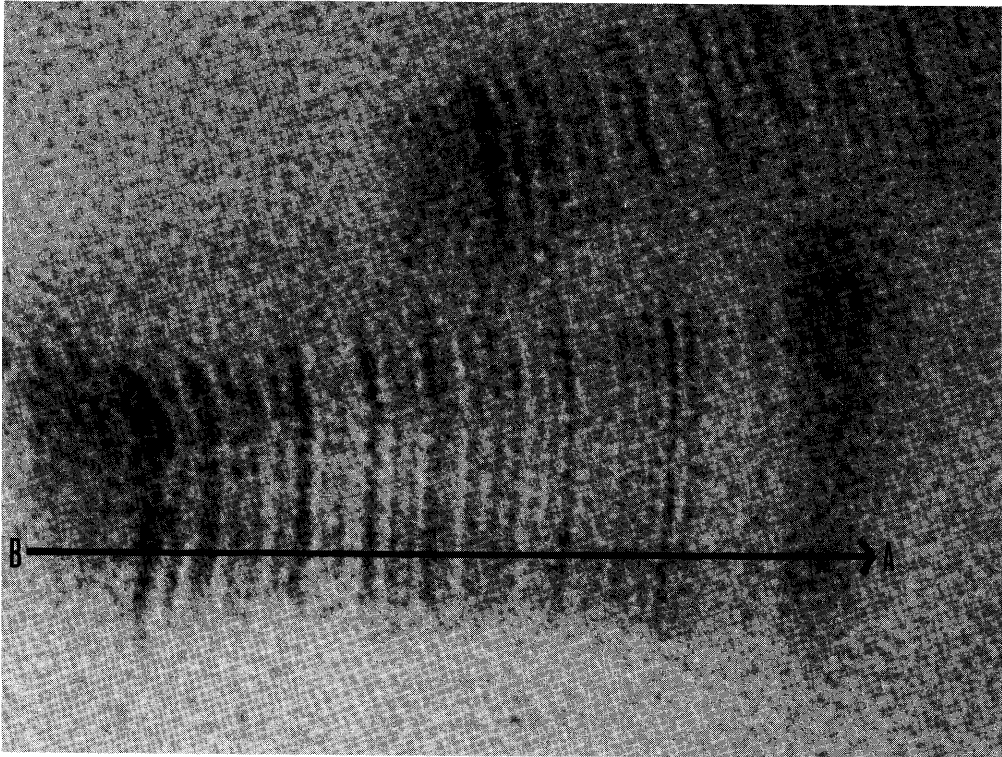


図 1

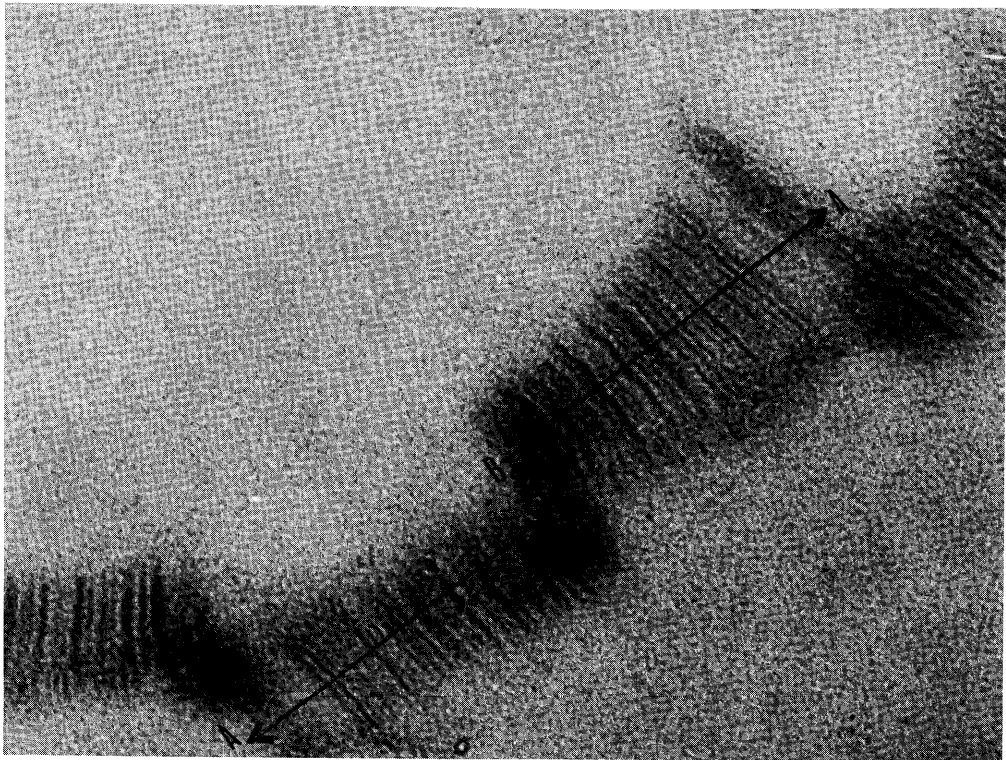
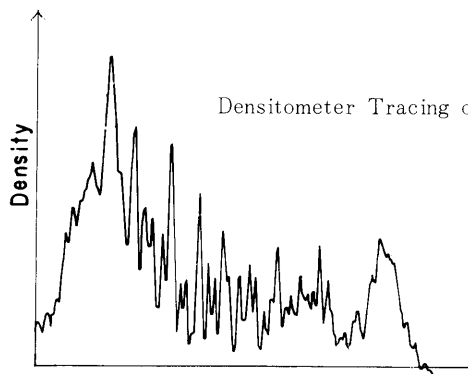


図 2



Densitometer Tracing of the SLS shown in Fig. 1

図 3

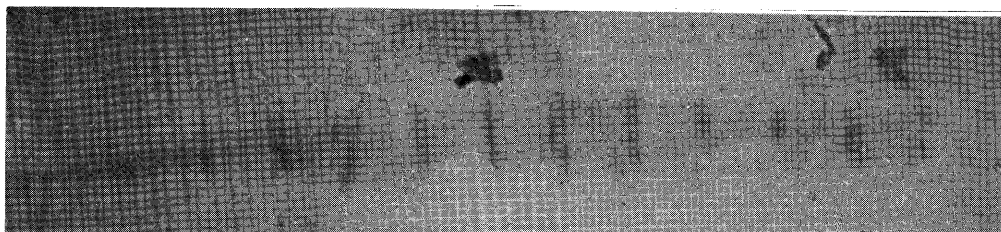


図 4

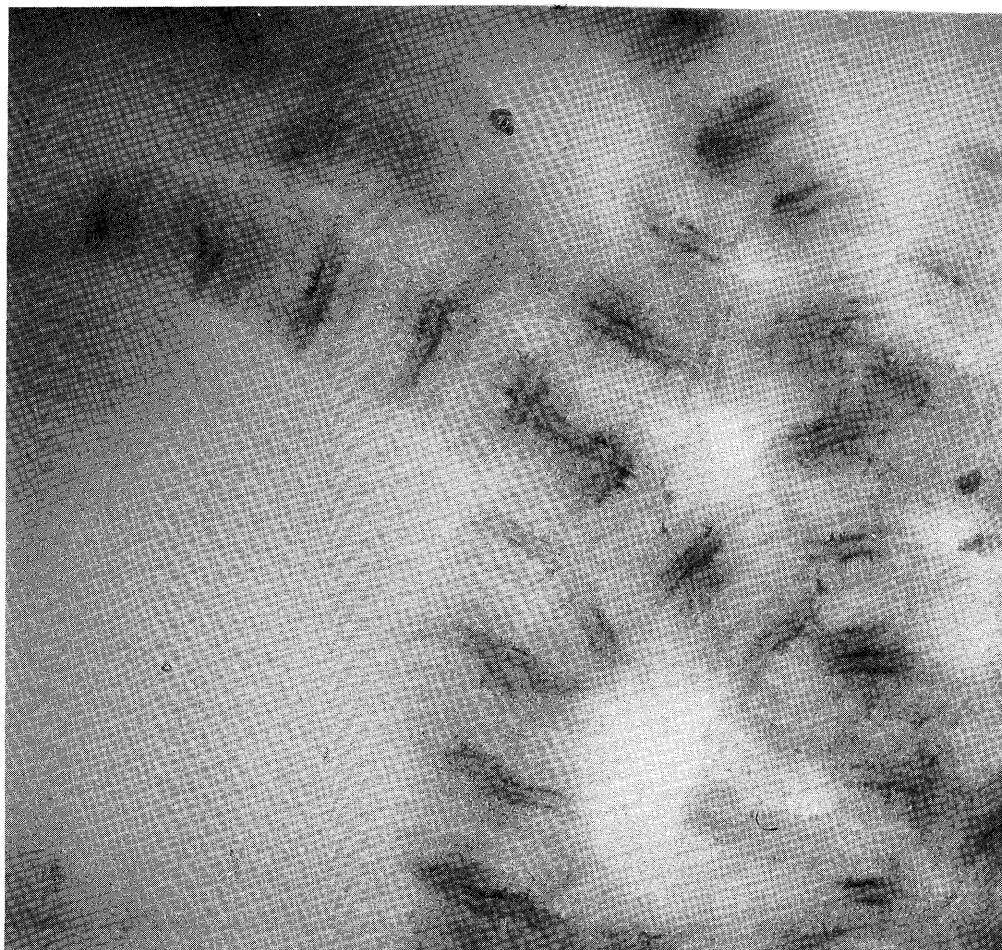


図 5