実験的肝線維症における肝内のコラーゲナーゼ活性

中 野 博 伊 藤 憲 一*

I 緒 言

肝の線維化は多くの場合、肝細胞の破壊に伴い二次的に生じてくるものと推定されているが、従来は主として形態学的な観察方法を用いてこの問題が検討されてきた。しかしながら、近年結合組織の生化学的知見が増大するにつれ、線維とくにコラーゲン線維の合成過程については、ほぼ定説と考えられる代謝系路が確立され、肝内の線維増生についてもこれがあてはまるものと考えられている。これに反し、脊椎動物とくに人間の生体内におけるコラーゲン線維の分解機序については不明の点が多く、まして肝内の線維分解過程についての知見はきわめて乏しい。

最近 Gross ら¹⁾は、変態期のオタマジャクシのヒレより生理的条件下でコラーゲンを分解するコラーゲナーゼを組織培養法を用いて証明した。その後このコラーゲナーゼは脊椎動物の子宮²⁾、皮膚^{3,4)}、歯肉⁵⁾および関節膜⁶⁾などに存在することが明らかとなり、コラーゲンの分解吸収に際してもっとも重要な意義を有する酵素と考えられている。今回我々は、肝において、とくに線維化を伴う肝でコラーゲナーゼが存在するか否かを検討するため、四塩化炭素投与によりラットに線維化を伴う慢性障害肝を作製し、Gross らの組織培養法を用いてコラーゲナーゼ活性の有無を検討したのでその成績について述べる。

II 実験材料および実験方法

i) 実験材料：実験には、体重 150~160 g の雄性ウィスター系ラットを用いた。また慢性障害肝の作製には、体重 100 g あたり 0.04 ml の四塩化炭素 (CCl_4) をオリーブ油にて 10 倍に希釈したものを週 2 回皮下に注射する方法を用いた。実験には、正常肝および、4 週間、8 週間、12 週間および 14 週間にわたり CCl_4 投与をつづけた 5 群をつくり、障害群ではいずれの群においても最後の CCl_4 注射を行った翌日、断頭屠殺したラットの肝を使用した。なお実験には各群とも 8 匹ずつについて検討を加えた。

ii) コラーゲナーゼ測定における基質の作製：Riley &

Peacock らの方法⁴⁾に従い、ラット皮膚より酸可溶性コラーゲンを抽出し、乾燥凍結後 -20°C にて保存し、必要に応じてその 60 μg に 0.4 M の無菌的磷酸緩衝液 15 ml を加えて、24 時間 4°C にて中性可溶性コラーゲンを振盪抽出、次いで 0.4 M の NaCl 液に対して十分透析した。次いで滅菌したグラスフィルターにて、不溶物を除去したのち、ペニシリンおよびストレプトマイシンを加えた 3 倍量のタイロッド培養液を加え、直径 3 cm のペトリ皿に厚さ約 3 mm になるように注入、 37°C にて固化化するまで静置しコラーゲンゲルを作製した。

iii) 組織切片の作製：動物より切除した肝は、抗生物質を加えたタイロッド液に約 30 分間浸し、可及的薄く、かつ無菌的に組織スライスを作った。次に直径 3mm の皮膚生検用の円形刀にて薄い円板状の組織片を作製、直ちに抗生物質を加えたタイロッド液、次いで抗生物質を加えないタイロッド液にて洗浄後、上記のコラーゲンゲルの上に、各ペトリ皿につき 2 個ずつの組織片を静置した。なお、コラーゲナーゼの検索に供した肝組織片は、各実験動物より得た 2 個ずつ、各群合計 16 個である。培養は 5% CO_2 、 37°C の条件下で 4 日間行った。

iv) コラーゲナーゼ活性の判定：コラーゲナーゼ活性の判定には、検索した組織片の周囲に明らかなコラーゲンゲルの融解帯を認めるものを陽性所見とした。なお、諸種バクテリアの繁殖したものは測定より除いて検討した。

III 成 績

正常および CCl_4 慢性障害肝について検索したコラーゲナーゼ活性は、表 1 に示した。正常肝ではほとんどコラーゲンゲルの融解帯を認めず、コラーゲナーゼ活性を証明しえない。4 週間にわたり CCl_4 の投与を行った慢性障害肝においても、コラーゲナーゼ活性を証明しえなかった。8 週間、12 週間および 14 週間 CCl_4 注射をつづけた慢性障害肝では、いずれも組織学的に肝線維化の像が認められ、長期間 CCl_4 注射を行った群ほど線維化の程度は強かった。このうち、8 週および 12 週間 CCl_4 注射を行った群では、検索しえた 8 個の肝組織片のうち、それぞれ 3 個の肝組織片について、コラーゲンゲルの融解帯

* H. Nakano, K. Ito : 京都大学 第 2 内科.

表 1. Collagenolytic activity in the liver of rat treated with carbontetra chloride

Duration of poisoning	No. of tissue specimens examined	Activity positive	Activity negative
Control	10	0	10
4 weeks	12	0	12
8 weeks	8	3	5
12 weeks	8	3	5
14 weeks	8	2	6

図 1.

を認めたが(図1),他の5個の肝切片については融解帯を証明しえなかった.また14週間にわたり CCl_4 投与をつづけた慢性障害肝では,検索した8個の肝組織片のうち,2個については明らかにコラーゲンゲルの融解帯を認め,コラーゲナーゼ活性の存在を証明しえたが,他の6個の肝組織片については,これを証明しえなかった.

IV 考 案

今日,脊椎動物中に見出されるコラーゲン分解酵素としては,今回我々が検討した組織培養法により検出できるコラーゲナーゼのほか,ライソゾーム由来のある種のカテプシンがある⁷⁾.前者すなわちコラーゲナーゼは,可溶性コラーゲンを二分する酵素であることが基礎学者により証明されており,後者すなわちライソゾーム由来のカテプシン系のコラーゲン分解酵素は,酸性のメジウムでコラーゲンを分解し,皮膚,心,骨,肝等で見出されている.しかしこのライソゾーム系のコラーゲン分解酵素は,著しい酸性を至適 pH とする点,生理的条件が要求される生体内の反応とは考えにくいように思われる⁷⁾.おそらくはコラーゲナーゼにより2分されたコラーゲン,あるいはそれよりも小分子のコラーゲン・ペプチドの

分解にあずかるものと考えるのが妥当であろう.

その他,コラーゲンの分解酵素の測定にはある種の合成基質を用い,ヒトの生体内における活性が観察されているが,それによると肝上清分画⁸⁾あるいは血清中⁹⁾に活性が存在することが報告されている.しかしこのもののコラーゲン代謝上の意義はまだ明らかにされていない.今回我々が用いた組織培養法により検出できるコラーゲナーゼは,現在のところ文献的にも生体内でもっとも重要なコラーゲン分解酵素であることは確かであり,しかも可溶性コラーゲン分解の第1段階であることもほぼ確実なようである.この種のコラーゲナーゼ活性は脊椎動物の皮膚^{3,4)},子宮²⁾,関節滑膜⁶⁾,骨¹⁰⁾,末梢白血球¹¹⁾,歯肉⁵⁾などに見出されているほか,実験的に作製した肉芽腫にも証明されている.しかしながら,肝線維症において組織培養法による真のコラーゲナーゼが肝内に証明されたとの報告はなかったが,今回の我々の報告によって肝にもコラーゲナーゼが存在することが明らかとなった.

一般にコラーゲン蛋白は,代謝回転の活発な中性可溶性コラーゲン,酸可溶性コラーゲンのほか,半減期の著しく長い不溶性コラーゲンが存在する.可溶性コラーゲンは不溶性コラーゲンの前駆物質であるが,不溶性コラーゲンに変化することなく分解過程をたどる比率が多いと考えられている. CCl_4 により作製された慢性障害肝および実験的肉芽腫などにおいては不溶性コラーゲンのほか,多量の可溶性コラーゲンを含んでおり,またコラーゲン分解の指標とされる尿中のハイドロキシ・プロリン・ペプチド量も増加している.

以上のような事実から,ヒトの肝においても線維増大の過程で肝内コラーゲンの合成が高まるとともに,一方では分解もまた亢進していることが推測され,その総和の結果コラーゲン含量の増加をきたすものと考えられる.今回行った我々の実験で肝内線維の増加に従い,コラーゲナーゼ活性の増大をみる傾向がうかがわれたのは,上記の機序を反映しているものであろう.今後肝内の線維吸収の時期を含めて,肝内に線維が存在する種々の時期にコラーゲンの合成側の検討あるいは,ライソゾーム系の分解酵素の態度をも同時に検索することにより,肝内の線維増大および吸収の機序を検討したいと考えている.

V 結 論

四塩化炭素により作製した慢性障害肝の肝内コラーゲナーゼ活性を,コラーゲンゲルを用いた組織培養法により検討した.正常肝,4週間障害肝では,肝内にコラーゲナ

ーゼ活性は検出できなかった。しかし四塩化炭素を8週、12週および14週間にわたり投与した障害群では、肝内に線維増生が認められ、この時期の肝では肝内にコラゲナーゼ活性の明らかな存在を認めえた。

終わりにご懇篤なるご指導、ご校閲を賜った深瀬政市教授に深謝する。

文 献 1) Gross, J. & Lapierre, C. M.: Proc. Nat. Acad. Sci. **48**: 1014, 1962. 2) Jeffrey, J. J. & Gross, J.: Fed. Proc. **26**: 670, 1967. 3) Eisen, A. Z., Jeffrey, J. J. & Gross, J.: Biochim. Biophys. Acta **151**: 637, 1968. 4) Riley, W. B. Jr. & Peacock, E. E. Jr.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. **124**: 207, 1967. 5) Ful-

lmer, H. M. & Gibson, W.: Nature **209**: 728, 1966.

6) Evanson, J. M., Jeffrey, J. J. & Krane, S. M.: Science **158**: 499, 1967. 7) Frankland, D. M. & Wynn, C. H.: Biochem. J., **85**: 276, 1962. 8) Sakai, T., Oda, T., Yokono, Y., Igarashi, S., Suzuki, H., Yoshitoshi, Y. & Ishii, K.: Clin. Chim. Acta. **15**: 321, 1967. 9) Gries, G., Buresch, H. & Strauch, L.: Experientia, **26**: 33, 1970. 10) Kaufman, E. J., Glimcher, M. J., Mechanic, G. L. & Goldhaber, P.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. **120**: 632, 1965.

11) Lazarus, G. S., Daniels, J. R.: Brown, R. S., Bladen, H. A. & Fullmer, H. M.: J. Clin. Invest. **47**: 2622, 1968.

*

*

*

*

*

*

*

*

*