原	著
---	---

ヒト好中球コラゲナーゼの精製, 単クローン 抗体の作製および歯肉溝滲出液中の好中球への応用

吉 田 直 樹

東京医科歯科大学歯学部第2 歯科保存学教室 (主任・指導: 石川 烈教授)

東京医科歯科大学難治疾患研究所成人疾患部門異常代謝学教室 (指導: 永井 裕教授)

(1992年12月20日 受付)

Purification of Human Neutrophil Collagenase, Establishment of its Monoclonal Antibodies and Application to Gingival Crevicular Neutrophils

Naoki Yoshida

Department of Periodontology, Faculty of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University

(Chief and Director : Prof. Isao Ishikawa)

Department of Tissue Physiology, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University

(Director : Prof. Yutaka Nagai)

In order to investigate the role of neutrophil collagenase in the periodontal disease, human neutrophil collagenase was purified and two monoclonal antibodies against this enzyme were obtained. This enzyme was purified by four step-affinity chromatography : heparin-aminocelulofine, gelatin Sepharose 4B, collagen-Sepharose and collagenase inhibitor column chromatographies.

To produce the monoclonal antibody against the enzyme, the Balb/c mouse was immunized and its spleen cells were fused with the mouse myeloma cells.

Two monoclonal antibodies to the enzyme, 2F3 (IgG1) and 3F12 (IgG1), which recognized a conformational structure of the enzyme apart from its catalytic site were obtained.

Both antibodies were monospecific to leukocyte collagenase and did not cross-react with the other metalloproteinases such as leukocyte gelatinase, skin fibroblast collagenase, gelatinase and stromelysin.

Using these monoclonal antibodies, collagenase was stained granularly in gingival crevicular neutrophils.

I. 緒 言

間質型コラゲナーゼは, 1962年, Gross, Lapierre, 永井によるオタマジクシ尾部の組織培養液から発見された¹⁻³⁾。その後, ヒトの組織においても,

歯肉, 皮膚, 骨などの結合組織, 胃⁴⁾, 卵巣⁵⁾などの臓器に, 本酵素は広く存在していることが明らかになった。また, 本酵素は歯周疾患⁶⁾, 慢性関節リウマチ⁷⁾などの病的な組織破壊におけるコラーゲンの分解亢進に重要な役割を担うと考えられて

いる。

本酵素は、I 型コラーゲンを $\alpha 1$ 鎖の775~776 残基 Gly-Ile 間、 $\alpha 2$ 鎖の775~776残基 Gly-Leu 間の特定の位置で切断し、TC^A (3/4断片) および TC^B (1/4断片) を形成する⁴⁾。形成された断片は体温の温度で変性されやすく、各種プロテアーゼで分解される。

生体由来のコラーゲナーゼのうち、好中球由来のコラーゲナーゼは、他の組織由来のコラーゲナーゼと比較して、III型コラーゲンを分解しにくいという報告⁸⁾があり、またクローニングされた cDNA より、線維芽細胞由来のコラーゲナーゼとは異なった遺伝子産物であるといわれている⁹⁾。

そこで本研究は、ボランティアの末梢血から分離した好中球の顆粒蛋白を出発材料に供し、アフィニティーカラムを用いて、エラスターゼ、ゼラチナーゼおよびコラーゲナーゼを分離することによって、コラーゲナーゼの精製を試み、さらにこれを抗原としてマウスに免疫し、単クローン抗体の作製を試みた。

II. 材料および方法

1. コラーゲナーゼ活性測定

永井らの方法^{10,11)}に従いコラーゲナーゼ活性を測定した。すなわち遮光チューブ内で試料溶液50 μ l に、0.2mM 4-aminophenylmercuric acetate (以下4-APMA と略)/0.05M Tris-HCl, pH7.6/0.2M NaCl/5mM CaCl₂ (以下 Tris-NaCl-CaCl₂ と略) 50 μ l を加え35℃ 2時間インキュベーションをして潜在型コラーゲナーゼを活性化した後、0.5 mg/ml FITC 標識ウシ I 型コラーゲン/Tris-NaCl-CaCl₂ 100 μ l とを35℃にて数時間反応させた後、80mM 0-phenanthroline/50%エタノール水10 μ l にて反応を停止し、25 μ g/ml ウシ膀胱エラスターゼ/Tris-NaCl-CaCl₂ 200 μ l を添加し、35℃10分間インキュベーションを行い、氷上で数分間冷却した後、70%エタノール-30% 0.17 M Tris-HCl, pH9.5/0.67M NaCl, 4℃, 400 μ l を加え激しく攪拌した後、遠心 (2,000回転, 20分) し、上清を蛍光分光光度計650-60型 (日立社製)

を用いて励起波長495nm, 蛍光波長520nm にて測定した。コラーゲナーゼ活性は、1 μ g コラーゲンを35℃, 1分間で分解するのに要する酵素量を1単位 (U) とした。

2. エラスターゼ活性の測定^{12,13)}

エラスターゼ活性の測定は、合成基質を用いて検討した。pyroglutamylprolylvalyl - para-nitroanilide 1mM/0.05M Tris-HCl, pH7.6/0.15M NaCl/10% dimethyl sulfoxide (以下 DMSO と略) 溶液50 μ l に試料10 μ l を添加し、37℃にて反応させ、405nm の吸光度を測定した。反応には96穴マイクロタイタープレート (COSTAR 社製) を用いた。37℃にて $\Delta A_{405nm} = 1.0/\text{min}$ を与える酵素活性を1単位 (U) と定義した。

3. ゼラチナーゼ活性の測定

ゼラチン分解活性は Sunada ら¹⁴⁾の方法を一部改変して測定した。0.5mg/ml FITC 標識ゼラチン (熱変性ウシ I 型コラーゲン)/Tris-NaCl-CaCl₂ 100 μ l と試料溶液100 μ l を遮光チューブ内で35℃にて反応させ、5.3%2M Tris-HCl, pH9.5/94.7% エタノール溶液750 μ l を加えて激しく攪拌した後、遠心 (2,000回転, 20分) し、上清を蛍光分光光度計650-60型 (日立社製) を用いて励起波長495nm, 蛍光波長520nm にて測定した。ゼラチナーゼ活性は、1 μ g ゼラチンを35℃, 1分間で分解するのに要する酵素量を1単位 (U) とした。潜在型ゼラチナーゼの活性化は、最終濃度1mM となるように4-APMA を試料溶液に加え、35℃, 2時間インキュベーションをすることにより行った。

4. ヒト好中球顆粒蛋白の調製

健康人のボランティアより採取した末梢血1.2l に Chodirker ら¹⁵⁾の方法に従い、3%デキストラン-3%デキストロースを400ml 加え1時間静置し、赤血球を沈降除去し、その上清をリン酸緩衝 (0.02M) 生理食塩水 (phosphate-buffered saline, 以下 PBS と略) による洗浄を繰り返して、その後 (600 $\times$ g) で遠心し、沈殿した白血球を採取した。さらに、0.83%NH₄Cl 溶液を用いて混在する赤血球を溶血させ、1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-ethane sulfonic acid, HEPES), pH7.2/0.15M NaCl 溶液30ml に白血球を懸濁した。

好中球の脱顆粒は Absolm ら¹⁶⁾の方法に従って行った。すなわち0.02% bovine serum albumin (以下 BSA と略)/0.01M HEPES, pH7.2/0.15M 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ザン A 10mg, サイトカラシン B 50 μ g の存在下で、37℃にて45分間脱顆粒させた。なお、ザイモザン A のオプソニン化は以下の方法で行った。ザイモザン A 150mg を PBS にて2回洗浄し、血清15ml を37℃にて20分間作用させた。その後 PBS にて1回、0.01M HEPES, pH7.2/0.15M NaCl 溶液にて1回洗浄後同溶液10ml 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ザンおよび顆粒をシャーレから採取した。回収液を遠心 (600 $\times$ g, 10 分) し、上清の顆粒画分を2回抽出した。顆粒を超音波破碎し、超遠心 (20,000 $\times$ 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コラゲナーゼの精製の材料とした。

5. ヒト好中球コラゲナーゼの精製

好中球顆粒タンパク画分を0.05M Tris-HCl pH7.6/0.05M NaCl/5mM CaCl₂緩衝液に透析し、析出した不溶性画分を遠心 (8,000rpm, 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に供した。

素通り画分に、残存するエラスターゼによるコラゲナーゼの分解を阻止する目的で、最終濃度1mM になるように、セリンプロテアーゼのインヒビターである phenylmethanesulfonyl fluoride (以下 PMSF と略) を加えた後、0.05M Tris-HCl, pH7.6/0.05M NaCl/5mM CaCl₂緩衝液に平衡化したゼラチンセファロース4B カラム (ファルマシア社製) に供した。

素通り画分に最終濃度0.1mM になるように4-APMA を加え35℃2時間インキュベートを行

い、潜在型コラゲナーゼを活性化した後、0.05M Tris-HCl, pH7.6/0.2M NaCl/5mM CaCl₂/0.01% Brij35 緩衝液に透析し、同液で平衡化したコラーゲンセファロースカラムに供した。吸着されたコラゲナーゼ画分を0.05M 酢酸カルシウム pH5.2/1.0M NaCl/0.01% Brij35/5 % dimethyl sulfoxide (以下 DMSO と略) 緩衝液にて溶出した。溶出液を5ml 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おのおのフラクションチューブに2M Tris-HCl, pH7.6, 500 μ l をあらかじめ加えておいた。

コラゲナーゼ画分を集め、0.05M Tris-HCl, pH7.6/0.2M NaCl/5mM CaCl₂/0.01% Brij35 緩衝液にて透析し、同緩衝液で平衡化した間質型コラゲナーゼインヒビターカラムにこれを供した。0.05M 酢酸カルシウム pH5.2/1.0M NaCl/0.01% Brij35/5 %DMSO 緩衝液にてコラゲナーゼを溶出した。溶出液を1ml 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おのおのフラクションチューブに2M Tris-HCl, pH7.6, 100 μ l をあらかじめ加えておいた。

6. SDS ポリアクリルアミド電気泳動

試料を0.01M Tris-HCl, pH8.0/1mM EDTA/10% Glycerol/1 % SDS/0.01% Bromphenol Blue 中で100℃2分加熱処理した後、Laemmli の方法¹⁷⁾に従い、電気泳動を行った。Phast System (Pharmacia 社) を使用し、ゲルは Phast Gel gradient 10-15 (Pharmacia 社)、泳動用緩衝液は Phast Gel SDS buffer Strips (Pharmacia 社) を用いた。泳動後は銀染色を行った。

7. 単クローン抗体の作製^{18,19)}

6 週齢オス Balb/c マウス皮下に精製コラゲナーゼ10 μ g とフロイントの完全アジュバントのエマルジョン0.1ml を注射し、14日後および28日後にブースターとして精製コラゲナーゼ10 μ g とフロイントの不完全アジュバントのエマルジョン0.1ml を再度皮下に注射した。29日後に脾細胞を採取し、 1.2×10^8 個の脾細胞に対し 4.0×10^7 個の P3U1 マウス骨髓腫細胞を45%ポリエチレングリコールを用いて融合させた後、20% fetal bovine

図1 ヘパリンアミノセルロースカラムクロマトグラフィー

矢印1 : 0.05M Tris-HCl, pH7.6/0.05M NaCl/5mM CaCl₂緩衝液による洗浄開始
 矢印2 : 0.05M Tris-HCl, pH7.6/0.2M NaCl/5mM CaCl₂緩衝液による洗浄開始
 矢印3 : 0.05M Tris-HCl, pH7.6/0.5M NaCl/5mM CaCl₂緩衝液によるエラスターゼ活性の溶出開始

図2 セラチンセファロース4Bカラムクロマトグラフィー

矢印1 : 0.05M Tris-HCl, pH7.6/0.2M NaCl/5mM CaCl₂緩衝液による洗浄開始
 矢印2 : 0.05M Tris-HCl, pH7.6/1M NaCl/5mM CaCl₂ 0.01% Brij 35 緩衝液による洗浄開始
 矢印3 : 0.05M Tris-HCl, pH7.6/1M NaCl/5mM CaCl₂/0.01% Brij 35/5% DMSO 緩衝液によるセラチナーゼ活性の溶出開始

serum (以下 FBS と略) を含む DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) の HAT (hypoxanthine-aminopterin-thymidine) 溶液で懸濁し細胞浮遊液を 100 μ l ずつ 96 穴プレートに分注し培養を行った。2 週間後より、ハイブリドーマが出現してきたウェルの培養上清を、PBS/0.05% Tween-20 溶液で 10 倍希釈したものを 1 次抗体として enzyme-linked immunosorbent assay 法 (以下 ELISA と略) により、抗ヒト好中球コラゲナ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。さらにクローニングおよびリクローニングを行い、選択されたハイブリドーマについて拡大培養を行い、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 (immunological 社製) を用いた二重免疫拡散法にて同定した。

8. ELISA

抗原として精製ヒト好中球コラゲナーゼ (約 1 μ g/ml) 13mM Na₂CO₃-35mM NaHCO₃, pH9.6 溶液を 96 穴マイクロタイタープレート (住友ベークライト社製) におおの 100 μ l コートし、4 $^{\circ}$ C 一夜静置した。0.9% NaCl/0.05% Tween-20 溶液で

洗浄後、プレートを 200 μ l の 3% カゼイン/PBS で室温 1 時間のブロック操作の後、洗浄、精製モノクローナル抗体 (OD 1.20) を PBS/0.05% Tween-20 溶液で段階希釈し、一次抗体として 100 μ l/well 添加し室温 2 時間静置した。洗浄後、2 次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体 (Tago 社) を PBS/0.05% Tween-20 による 1,000 倍希釈液 100 μ l を加え、室温 2 時間静置、洗浄し、100 μ l の 0.002% H₂O₂/0.05% o-phenylene diamine, pH5.5 溶液を加えて発色させ、15 分反応後、450nm の吸光度を測定した。

9. ビーズ法²⁰⁾を用いたコラゲナーゼ活性による抗体の性質の検討

ポリスチレンビーズ (直径 1/4 インチ, ポリサイエンス社製) に、PBS で 100 μ g/ml に希釈した抗マウス IgG 抗体 (ジャクソン社) を 4 $^{\circ}$ C 1 夜コートし、0.9% NaCl/0.05% Tween-20 溶液で洗浄、ブロックエース (大日本製薬) で室温 2 時間ブロッキングを行い、洗浄した後、無血清で培養したハイブリドーマの培養上清を PBS/0.05% Tween-20 で 4 倍希釈した溶液中で 37 $^{\circ}$ C, 2 時間振盪さ

表1 ヒト好中球コラゲナーゼの精製各段階における、コラゲナーゼ活性および回収率

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (Units)	Recovery (%)	Specific activity (Units/mg)	Purification
Starting material	57.4	287	100	5.0	1.0
Heparin-aminocellulofine	56.2	417	145	7.4	1.5
Gelatin-Sepharose4B	49.9	261	91	5.2	1.0
Collagen-Sepharose	0.56	124	43	221	44
Collagenase inhibitor	0.075	42	15	560	112

図3 コラーゲンセファロースカラムクロマトグラフィー

矢印1 : 0.05M Tris-HCl, pH7.6/0.2M NaCl/5mM CaCl₂/0.01% Brij 35 緩衝液による洗浄開始

矢印2 : 0.05M Tris-HCl, pH7.6/1M NaCl/5mM CaCl₂/0.01% Brij 35 緩衝液による洗浄開始

矢印3 : 0.05M 酢酸カルシウム, pH5.2/1M NaCl/0.01% Brij 35/5% DMSO 緩衝液によるコラゲナーゼ活性溶出開始

せた。洗浄後のビーズを2.6U/mlに0.05M Tris-HCl, pH7.6/0.15M NaCl/5mM CaCl₂/0.05% Brij35 緩衝液で希釈した活性型の精製コラゲナーゼ中に4℃, 10時間静置した。洗浄後、ビーズを0.25mg/ml FITC 標識ウシI型コラーゲン/0.05M Tris-HCl, pH7.6/0.2M NaCl/5mM CaCl₂溶液220μl に入れ、遮光チューブ内で35℃で反応後の200μlを方法1.と同じ要領で分解したコラーゲン量を測定した。

図4 間質型コラゲナーゼインヒターカラムによるアフィニティークロマトグラフィー

矢印1 : 0.05M Tris-HCl, pH7.6/0.2M NaCl/5mM CaCl₂/0.01% Brij 35 緩衝液による洗浄開始

矢印2 : 0.05M 酢酸カルシウム pH5.2/1M NaCl/0.01% Brij 35/5% DMSO 緩衝液による溶出開始

10. 免疫組織化学

末梢血中の好中球またはピペット (エッペンドルフ社)を用いて、10μlのPBSで洗浄することによって採取した、頬側歯間乳頭部歯肉溝滲出液中の多形核白血球²¹⁾を、スライドガラス上に塗抹、乾燥後-20℃にて100%アセトンで10分間固定後、PBSで洗浄し、5%正常兔血清(ダコ社)と10%BSAを含むPBSをコートし30分間室温に静置、洗浄後、各クローンの培養上清をコートし、4℃、

図5 精製ヒト好中球コラゲナーゼのSDS-PAGEの結果(10~15%グラジエントゲル, 非還元, 銀染色像)

左レーン, 最終精製物, 右レーンは好中球顆粒蛋白画分

一夜静置した。洗浄後, FITC 標識兔抗マウス IgG 抗体(ダコ社)をコートし, 洗浄後, 蛍光顕微鏡(ZEISS 社)下で観察した。

III. 結 果

1. ヒト好中球コラゲナーゼの精製

好中球コラゲナーゼの各精製段階のタンパク量, 精製率, コラゲナーゼ活性および比活性は表1に示すとおりである。

ヘパリンアミノセルロファインカラムクロマトグラフィーでは, コラゲナーゼ活性は素通り画分に認められ, 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(図1)。

ゼラチンセファロース 4 B カラムクロマトグラフィーでは, コラゲナーゼ活性は素通り画分に認められ, ゼラチナーゼ活性は0.05M Tris-HCl pH7.6/1M NaCl/5mM CaCl₂/0.01%Brij35/5% DMSO 緩衝液で溶出された(図2)。

コラーゲンセファロースカラムクロマトグラフィーでは, 上記のクロマトグラフィーにおいてコラゲナーゼは素通り画分に認められたのに対し, 酢酸カルシウム緩衝液による溶出画分に認められ, 精製率は44倍に上昇した(図3)。

間質型コラゲナーゼインヒビターカラムクロマ

図6 ヒト好中球コラゲナーゼ(1 µg/ml)を抗原とし, 2F3, 3F12 を一次抗体とした ELISA のタイトレーションカーブ

トグラフィーでは, コラゲナーゼ活性は酢酸カルシウム緩衝液による溶出画分に認められた。精製率は112倍, 比活性は560U/mgであった(表1, 図4)。

また, 精製したコラゲナーゼは, SDS-PAGE 上で分子量約75K の単一バンドであった(図5)。

2. 作製した単クローン抗体の性質

細胞融合を行った後, ハイブリドーマの形成がみられたウェルは424ウェル中419ウェル(98.8%)であった。得られた419ウェルのハイブリドーマを, ELISA 法でスクリーニングしたが, その基準としては, 精製したヒト好中球コラゲナーゼ(1 µg/ml)を抗原とした際に OD>0.3 を示すものとした結果, 19クローンが選択された。その19クローンを限界希釈法を用いてクローニングおよびリクローニングを行い, 最終的に ELISA 法で, 抗原(+)の際に OD>0.3, 抗原(-)の際に OD<0.05 の基準で, 2クローンが得られた。

得られた2クローン2F3, 3F12 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を用いて検討した結果, 両クローンとも, 作製抗体と抗マウス IgG1 との反応による免疫沈降線1本のみが出現した。また, ELISA 法で, 3F12 は2F3 より, ヒト好中球コラゲナーゼに対して強いアフィニティーをもつことが確かめられた(図6)。また,

図7 ビーズ法の結果

両クローンとも、60℃10分間、熱変性させたヒト好中球コラゲナーゼとは反応しなかった。両クローンとも、ヒト好中球ゼラチナーゼ、ヒト線維芽細胞コラゲナーゼ、ヒト線維芽細胞ゼラチナーゼ、ヒト線維芽細胞ストロムライシンとは反応しないことが確かめられた。また、両クローンとも、ヒト好中球コラゲナーゼの活性は阻害せず、ポリスチレンビーズ上の抗原抗体複合体はコラゲナーゼ分解活性を示した（図7）。

3. 免疫組織化学

歯肉溝滲出液中の好中球は、3F12による免疫蛍光抗体間接法による染色で、細胞内に顆粒状に陽性な像が得られた（図8）。末梢血中の好中球でも同様の染色像が得られた。

IV. 考 察

細胞外マトリックスの分解に関与する酵素は、種々のものが存在するが、コラゲナーゼは、未変性の線維性コラーゲンを生理的温度で、1/4と3/4のフラグメントに分解し、他のプロテアーゼによって、さらに細かいフラグメントに分解されることを可能にする点で、キーエンザイムと考えられる。また、以前より好中球由来のコラゲナーゼは線維芽細胞、滑膜細胞、マクロファージ由来のコラゲナーゼとは、分子量²²⁾、基質特異性⁸⁾、抗体との反応性²³⁾などが異なっているという報告がなされていたが、近年、cDNAがクローニングされ⁹⁾、異なる遺伝子産物であることが明らかになった。本研究は、好中球コラゲナーゼの精製を行い、同酵素に対する単クローン抗体を作製し、同抗体の性質を検討、さらに歯肉溝滲出液中の好

図8 歯肉溝滲出液中の好中球に対する3F12クローンをを用いた免疫蛍光染色
細胞内に顆粒状に陽性反応がみられる

中球に対する免疫染色を行った。

好中球コラゲナーゼの精製に関して、多くの精製法が報告されているが^{22,24,25)}、本研究における精製法の特徴は、好中球由来のエラスターゼ^{26~28)}およびゼラチナーゼ^{29,30)}をアフィニティーカラムを用いて分離した後に、コラゲナーゼをアフィニティーカラムを用いて精製した点にある。この方法により、比較的容易に好中球よりコラゲナーゼとともにエラスターゼ、ゼラチナーゼも分離できた。ヘパリンセファロースカラムクロマトグラフィーでは、コラゲナーゼおよびゼラチナーゼは素通り、エラスターゼは吸着されることより、エラスターゼを分離した。素通り画分にPMSFを加えることは残存エラスターゼによりコラゲナーゼが分解を受けるのを防ぐために有効であると考えられる。次に、ゼラチンセファロース4Bカラムクロマトグラフィーでは、コラゲナーゼは素通り、ゼラチナーゼは吸着することにより、ゼラチナーゼを分離した。また、本クロマトグラフィー以降の精製過程においては、緩衝液中に0.01%Brij35を加えているが、酵素が試験管の管壁に吸着し回収が低下するのを阻止するために有効であると考えられる。次に、素通り画分を、コラーゲンセファロースカラムに供したが、この画分のコラゲナーゼは主に潜在型であり、コラーゲンセファロースには吸着しないので、4-APMAによって活性化を行った後に供した。このクロマトグラフィーにおいてコラゲナーゼの精製率は著しく上昇した。

酸性の緩衝液で溶出を行っているため、酵素の失活を防ぐ目的で、溶出液を即座に中性にすることは、重要な操作であると考えられる。精製の最終段階に用いた間質型コラゲナーゼインヒビターカラムクロマトグラフィーでは、回収率は低下したが、比活性は560U/mgにさらに上昇した。

精製したヒト好中球コラゲナーゼは、活性型コラゲナーゼであるが、SDS-PAGEを用いて、分子量を検討した結果、75Kの単一バンドとして認められた。75Kという分子量は、cDNAから予想される蛋白の分子量⁹⁾より大きい、その理由としては、ポリペプチド鎖に結合している糖鎖のためと考えられる。

次に、今回得られた2種の単クローン抗体の性質に関して述べる。3F12は、2F3よりもヒト好中球コラゲナーゼに対するアフィニティーが強い。また両クローンとも、他のマトリックス分解酵素である、ヒト好中球ゼラチナーゼ、ヒト皮膚線維芽細胞由来コラゲナーゼ、ゼラチナーゼおよびストロムライシンとは交叉反応が認められず、ヒト好中球コラゲナーゼを特異的に認識することが確認された。さらに、両クローンとも、コラゲナーゼ活性を阻害しないが、抗原抗体複合体はコラーゲン分解活性を示すことと、60℃で10分間熱変性させたコラゲナーゼとは反応しないことより、コラゲナーゼの活性中心から離れた部位のコンフォメーションを認識していることが示された。このような抗体の性質はHastyら²³⁾が報告した、好中球のコラゲナーゼ活性を阻害し、皮膚コラゲナーゼとリウマチ滑膜コラゲナーゼの活性は阻害しない抗体とは、異なっていると考えられた。

次に2種の単クローン抗体を用いて歯肉溝滲出液中の好中球に対して、免疫組織染色を行った結果、細胞内に顆粒状に陽性に反応している像が得られた。好中球コラゲナーゼは、特殊顆粒に存在している³¹⁾と考えられており、本抗体は、特殊顆粒のコラゲナーゼに反応している可能性が考えられる。

歯肉溝滲出液中のプロテアーゼに関してはカテプシンD^{32,33)}、コラゲナーゼ^{32,34)}、エラスターゼ³²⁾

の活性が歯肉の炎症の程度に伴い増加しているという報告がある。

また、歯周組織とコラゲナーゼの関連を調べた研究としては、ヒト歯肉の抽出液中に間質型コラゲナーゼ活性が認められたという報告³⁵⁾や、抗ヒトコラゲナーゼポリクローナル抗体を用いた免疫組織化学法によって炎症歯肉にコラゲナーゼを同定したが、コラゲナーゼの由来については不明であるという報告³⁵⁾があるが、今回の研究は、歯肉溝滲出液中の好中球の細胞内にコラゲナーゼの蛋白の存在を明らかにした最初の報告である。

炎症歯肉組織および歯肉溝滲出液中のコラゲナーゼの由来細胞に関して、成人性歯周炎では、炎症歯肉の抽出物、歯肉溝滲出液および唾液中のコラゲナーゼは分子量、基質特異性、および活性化の機構の特徴より、好中球由来のコラゲナーゼが優位と考えられるという報告³⁷⁾や、若年性歯周炎では、歯肉溝滲出液中のコラゲナーゼは基質特異性の特徴が、線維芽細胞、上皮細胞およびマクロファージの産生するコラゲナーゼの特徴を示しているという報告³⁸⁾がある。

しかし、実際に歯根膜線維の破壊に関与しているコラゲナーゼを産生している細胞に関しては、不明な点が多い。今後、炎症局所におけるコラゲナーゼの由来細胞を蛋白レベルで明らかにしていくうえで、好中球由来のコラゲナーゼのみを認識し、線維芽細胞のコラゲナーゼを認識しないという性質をもった、本研究で得られた抗体は有用であると考えられる。

V. 結 論

ヒト好中球コラゲナーゼの精製および、同酵素を認識する単クローン抗体の作製を試みたところ、以下の結果を得た。

1. ヒト末梢血1.2lから、75μg、比活性560U/mgの精製ヒト好中球コラゲナーゼが得られた。
2. コラゲナーゼの分子量はSDS-PAGE上で75Kの単一バンドであった。
3. 2F3 (IgG1)、3F12 (IgG1)の2種の、ヒト好中球コラゲナーゼを認識する単クローン抗体が

得られた。

4. 得られた単クローン抗体はともに、コラゲナーゼ活性を阻害せず、抗原抗体複合体はコラゲナーゼ活性を示した。

5. 得られた単クローン抗体はともに、好中球コラゲナーゼに特異的に反応し、好中球ゼラチナーゼ、線維芽細胞由来コラゲナーゼ、線維芽細胞由来ゼラチナーゼ、線維芽細胞由来ストロムライシンとは交叉反応を示さなかった。

6. 得られた単クローン抗体は、免疫組織化学染色において、歯肉溝滲出液中の好中球の細胞内に顆粒状に陽性の所見が得られた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご懇篤なご指導とご校閲を賜りました石川烈教授に深甚の感謝を捧げますとともに、終始懇切丁寧なご教授とご校閲をいただきました永井裕教授に衷心より感謝を捧げます。また、本研究を進めるにあたり、終始ご指導、ご鞭撻をいただきました堀久枝博士ならびに金森哲子先生に深く感謝するとともに異常代謝学教室ならびに第2歯科保存学教室の諸先生方のご厚意に深謝いたします。

なお本研究の要旨は、第65回日本生化学会大会(平成4年10月, 福岡), 第35回秋季日本歯周病学会(平成4年10月, 札幌)において発表した。

文 献

- 1) Gross, J. and Lapiere, C. M. : Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 48 : 1014-1022, 1962.
- 2) Nagai, Y., Lapiere, C. M. and Gross, J. : Isolation and partial characterization of an animal collagenolytic enzyme. *Federation Proc.* 22 : 648, 1963.
- 3) Gross, J. and Nagai, Y. : Specific degradation of the collagen molecule by tadpole collagenolytic enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 54 : 1197-1204, 1965.
- 4) Gross, J. : Aspects of the animal collagenases. In Ramachandran, G. N. and Reddi, A. H. (eds.), *Biochemistry of collagen*. New York, 1976, Plenum Press, 275-317.
- 5) 矢島康雄, 福本 学, 岡村 均, 西村敏雄 : ヒト

卵巣における vertebrate collagenase 活性. *日本産婦人科誌* 32 : 799-805, 1980.

- 6) Fullum, H. M. and Gibson, W. : Collagenolytic activity in gingivae of man. *Nature* 209 : 728-729, 1966.
- 7) Harris, Jr. E. D. and Krane, S. M. : Collagenases. *N. Engl. J. Med.* 291 : 557-563, 605-609 and 652-661, 1974.
- 8) Horwitz, A. L., Hance, A. J. and Crystal, R. G. : Granulocyte collagenase; Selective digestion of type I relative to type III collagen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74 : 897-901, 1977.
- 9) Hasty, K. A., Pourtmotabbed, T. F., Goldberg, G. I., Thompson, J. P., Spinella, D. G., Stevens, R. M. and Mainardi, C. L. : Human neutrophil collagenase; a distinct gene product with homology to other matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 265 : 11421-11424, 1990.
- 10) 永井 裕, 堀 久枝, 服部俊治, 砂田泰伸, 寺戸国昭, 橋田亮一, 宮本和代 : コラゲナーゼ活性の簡易微量測定法の開発とその応用. Part I FITC-標識コラーゲンをを用いたコラゲナーゼ活性微量測定法. *炎症* 4 : 123-130, 1984.
- 11) 永井 裕, 堀 久枝, 服部俊治, 砂田泰伸, 寺戸国昭, 橋田亮一, 宮本和代 : コラゲナーゼ活性の簡易微量測定法の開発とその応用. part II 応用 : コラゲナーゼ活性測定のための検体組織および体液の前処理(活性化). *炎症* 4 : 247-254, 1984.
- 12) Kramps, J. A., Twisk, Ch. van and Linden, A. C. van der. : L-Pyroglutamyl-L-prolyl-L-valine-p-nitroanilide, a highly specific substrate for granulocyte elastase. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 43 : 427-432, 1983.
- 13) 渡辺秀人 : 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. *金沢大学十全医学誌* 98 : 1-18, 1989.
- 14) Sunada, H. and Nagai, Y. : A rapid microassay for gelatinolytic activity using tritium-labeled heat-denatured polymeric collagen as a substrate and its application to the detection of enzyme involved in collagen metabolism. *J. Biochem.* 87 : 1765-1771, 1980.
- 15) Chodirker, W. B., Bock, G. N. and Vaughan, J. H. : Isolation of human PMN leukocytes and on heparin. *J. Lab. Clin. Med.* 71 : 9-19, 1968.
- 16) Absolm, D. R. : Basic methods for the study of phagocytosis. In Sabato, G. D. and Everse, J. (eds.), *Methods in Enzymology*, 132, Orland, 1987, Academic Press, Inc., 95-182.
- 17) Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680-685, 1970.
- 18) Goding, J. W. : Antibody production by

- hybridomas. *J. Immunol. Meth.* 39 : 285-308, 1980.
- 19) Douilland, J. Y., Hoffman, T. and Herberman, R. B. : Enzyme-linked immunosorbent assay for screening monoclonal antibody production ; Use of intact cells as antigen. *J. Immunol. Meth.* 39 : 309-316, 1980.
 - 20) 小林孝志 : タイアラライザーを用いたヒト好中球ゼラチナーゼの精製と単クローン抗体の作成. *日本皮膚科誌* 102 : 789-796, 1992.
 - 21) Loeshce, W. J., Robinson, J. P., Flynn, M., Hudson, J. L. and Duque, R. E. : Reduced oxidative function in gingival crevicular neutrophils in periodontal disease. *Infect. Immun.* 56 : 156-160, 1988.
 - 22) Murphy, G., Bretz, U., Baggiolini, M. and Reynolds, J. J. : The latent collagenase and gelatinase of human polymorphonuclear neutrophil leucocytes. *Biochem. J.* 192 : 517-525, 1980.
 - 23) Hasty, K. A., Hibbs, M. S., Kang, A. H. and Mainardi, C. L. : Heterogeneity among human neutrophil collagenases demonstrated by monoclonal antibody that selectively recognizes and inhibits human neutrophil collagenase. *J. Exp. Med.* 159 : 1455-1463, 1984.
 - 24) McCartney, H. W. and Tschesche, H. : Latent and active human polymorphonuclear leukocyte collagenases. Isolation, purification and characterization. *Eur. J. Biochem.* 130 : 71-78, 1983.
 - 25) Mookhtiar, K. A. and Van Wart, H. E. : Purification to homogeneity of latent and active 58-kilodalton forms of human neutrophil collagenase. *Biochemistry* 29 : 10620-10627, 1990.
 - 26) Watanabe, H., Hattori, S., Katsuda, S., Nakaniishi, I. and Nagai, Y. : Human neutrophil elastase ; Degradation of basement membrane components and immunolocalization in the tissue. *J. Biochem.* 108 : 753-759, 1990.
 - 27) Janoff, A. : Elastase in tissue injury. *Ann. Rev. Med.* 36 : 207-216, 1985.
 - 28) Barret, A. J. : Leukocyte elastase in Loland, L. (eds.) , *Methods in Enzymology* 80, Orland, 1981, Academic Press, Inc., 581-588.
 - 29) Hibbs, M. S., Hasty, K. A., Seyer, J. M., Kang, A. H. and Mainardi, C. L. : Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase. *J. Biol. Chem.* 260 : 2493-2500, 1985.
 - 30) Rantala-Ryhänen, S., Ryhanen, L., Novak, F. V. and Uitto, J. : Proteinases in human polymorphonuclear leukocytes. Purification and characterization of an enzyme which cleaves denatured collagen and a synthetic peptide with a Gly-Ile sequence. *Eur. J. Biochem.* 134 : 129-137, 1983.
 - 31) Murphy, G., Reynolds, J. J., Bretz, U. and Baggiolini, M. : Collagenase is a component of the specific granules of human neutrophil leucocytes. *Biochem. J.* 162 : 195-197, 1977.
 - 32) Cimasoni, G. and Kowashi, Y. : Proteinases of the gingival crevice and their inhibitors. In Lehner, T. and Cimasoni, G. (eds.), *the borderland between caries and periodontal disease II*. London, 1980, Academic Press, 31-49.
 - 33) Ishikawa, I., Cimasoni, G. and Ahmed-Zadeh, C. : Possible role of lysosomal enzymes in the pathogenesis of periodontitis. A study on cathepsin D in human gingival fluid. *Arch Oral Biol.* 17 : 111-117, 1972.
 - 34) Kowashi, Y., Jaccard, F. and Cimasoni, G. : Increase of free collagenase and neutral protease activities in the gingival crevice during experimental gingivitis in man. *Archs. Oral Biol.* 24 : 645-650, 1979.
 - 35) Uitto, V-J., Turto, H. and Saxen, L. : Extraction of collagenase from human gingiva. *J. Periodont. Res.* 13 : 207-214, 1978.
 - 36) Woolley, D. E. and Davies, R. M. : Immunolocalization of collagenase in periodontal disease. *J. Periodont. Res.* 16 : 292-297, 1981.
 - 37) Sorsas, T., Suomalainen, K. and Uitto, V-J. : The role of gingival crevicular fluid and salivary interstitial collagenases in human periodontal diseases. *Archs. Oral Biol.* 35 : 193S-196S, 1990.
 - 38) Suomalainen, K., Sorsa, T., Saxen, L., Vauhkonen, M. and Uitto, V-J. : Collagenase activity in gingival crevicular fluid of patients with juvenile periodontitis. *Oral Microbiol. Immunol.* 6 : 24-29, 1991.