

# コラゲナーゼ活性の新しい迅速測定法の 検討とその応用

## 第 2 編

### ヒト好中球および関節液コラゲナーゼ 活性測定への溶液法の応用

岡山大学医学部第3内科教室（主任：大藤真教授）

寺 戸 国 昭

#### I 緒 言

コラゲナーゼは種々の動物のほとんどすべての組織に存在し、<sup>1)</sup>生理的および病理的状态を問わず、結合組織の代謝に関与している。しかし、それらの組織の中で、直接活性を示すいわゆる活性型コラゲナーゼの存在が知られているのは、好中球の lysosome<sup>2)</sup>と慢性関節リウマチ患者の関節液<sup>3)</sup>などであり、通常は大部分が不活性型（潜在型および阻害された型を含む）で存在しているものと考えられている。<sup>4,5)</sup>従って、いかなる機序により、このコラゲナーゼ活性の発現および抑制の調節がなされているのか、またこの酵素活性の制御と結合組織疾患にはいかなる関係が存在するのかを解明することは、今日もっとも注目されている課題である。

一方、コラゲナーゼ活性は、前報<sup>7)</sup>に述べたように、主に<sup>14</sup>C 標識コラーゲンの再生線維を基質としたゲル法<sup>8,9)</sup>により測定されており、反応時間が長く、しかも酵素量と酵素活性の直線性の得られる範囲も狭いため、コラゲナーゼの活性化や不活性化の機構を解明したり、多数の臨床材料について酵素活性を測定するには不向きであり、前報の溶液法<sup>7)</sup>の採用が望まれる。

しかし、コラゲナーゼは動物種や組織が異なると、特異性に差があるかも知れず、<sup>10)</sup>そこに含まれる夾雑物の種類も量も異なるため、すべてのコラゲナーゼについて、オタマジャクシコラゲナーゼと同様に前報の溶液法<sup>7)</sup>をそのまま適用できるとは限らない。そこで、今後臨床で、注目されるであろうヒト好中球および関節液コラゲナーゼの活性測定に対し、溶液法の適用の可否を検討し、あわせて各種疾患患者

好中球および慢性関節リウマチ患者関節液中のコラゲナーゼ活性を測定した。

#### II 実験材料

##### <sup>14</sup>C 標識コラーゲン

コラゲナーゼ活性測定の前報<sup>7)</sup>の基質として、前報のごとく、pH 7.8、0.2% <sup>14</sup>C-glycine 標識モルモット皮膚コラーゲン (1200 cpm/mg)<sup>9)</sup>溶液 0.4 ml (ゲル法) および 0.2 ml (溶液法) を用いた。<sup>7)</sup>

##### o-phenanthroline 溶液

前報に示した 80 mM 溶液<sup>7)</sup>をコラゲナーゼ反応停止に用いた。

##### 好中球コラゲナーゼ

好中球は岡山大学医学部附属病院第3内科の入院および外来患者、および正常人対照として同第3内科医局員より採血したヘパリン加新鮮血 5 ml より Dioguardi ら<sup>11)</sup>の 0.83% 塩化アンモン溶液による溶血法により分離した。えられた好中球は 1.5 ml の 0.2 M NaCl および 5 mM CaCl<sub>2</sub> を含む 0.05 M Tris-HCl 緩衝液 pH 7.8 (以下 0.05 M Tris-NaCl-CaCl<sub>2</sub> と略す) に懸濁後、凍結融解を 3 度くりかえし、10,000 g で 10 分間遠沈し、その上清 (蛋白 0.5~1.1 mg を含む) を酵素溶液として用いた。

##### 関節液コラゲナーゼ

岡山大学医学部附属病院第3内科入院および外来の慢性関節リウマチ (以下 RA と略す) および変形性関節症 (以下 OA と略す) 患者よりえた関節液を、阿部ら<sup>5)</sup>の方法に従い、3 M NaI の代わりに 3 M KI 処理し、コラゲナーゼを活性化したものを用いた。

#### III 方 法

#### 溶液法によるコラーゲナーゼ活性の測定

前報<sup>7)</sup>と同じく、0.2 ml の 0.2% <sup>14</sup>C 標識コラーゲン溶液を基質とし、35℃で測定した。ただし、分解産物の抽出は、好中球コラーゲナーゼ活性測定の場合には反応液 0.4 ml に対し、等量の dioxane (最終濃度 50%) を加えて行なったが、関節液コラーゲナーゼの場合は、最終 dioxane 濃度が 35% となるよう、反応液と等量の 70% dioxane/水 を加え抽出した。

#### ゲル法によるコラーゲナーゼ活性の測定

0.4 ml の 0.2% <sup>14</sup>C 標識コラーゲンゲルを基質とし、前報<sup>7)</sup>と同じく、35℃で行なった。

#### casein 分解活性の測定

好中球抽出物中の中性 protease 活性は、永井ら<sup>8)</sup>の方法に従い、0.6% casein 溶液を基質とし、pH 8.0、37℃で測定した。

#### 蛋白の定量

前報と同様に Lowry 法<sup>12)</sup>によった。

#### disk 電気泳動

前報と同様に永井ら<sup>13)</sup>の方法によった。

### IV 結 果

#### (1) 変性コラーゲンの dioxane 抽出におよぼす好中球抽出物および関節液の影響

未変性コラーゲンは pH 7.8 で 33% 以上の dioxane 溶液には不溶であるのに対し、変性コラーゲンは 50% dioxane 溶液に可溶性であり、多量のオタマシヤクシ皮膚培養液よりえられた蛋白によりその溶解度は影響されないことを前報に示した<sup>7)</sup>しかし、好中球抽出物および、とくに関節液では蛋白の他に多量

の多糖体などを含んだ非常に粘性の高い液であり、これらを酵素溶液として用いた場合の反応液からのコラーゲンの分解産物(変性コラーゲン)の dioxane による抽出条件を検討した。

その結果は表 1 に示したごとく、好中球抽出物(蛋白として 300 μg) は変性コラーゲンの 50% dioxane への溶解度にまったく影響を与えず、好中球抽出物共存時でも <sup>14</sup>C 標識変性コラーゲンは 50% dioxane 抽出上清中に 100% 回収された。一方、関節液 (50 μl) 共存時では、<sup>14</sup>C 標識変性コラーゲンは 50% dioxane 中で関節液中の成分と共沈し、49% しかその上清に放射活性は回収されなかった。しかし、dioxane 濃度 30~35% では、未変性コラーゲンはほとんどその上清中に抽出されないのに対し、変性コラーゲンは関節液 50~100 μl 共存時にも、関節液中の成分と共沈することなく、その上清中に定量的に抽出することができた。

(2) 好中球および関節液コラーゲナーゼによるコラーゲン分解産物の変性とその dioxane 抽出  
o-phenanthroline によるコラーゲナーゼ反応の停止ならびに好中球および関節液コラーゲナーゼによるコラーゲン分解産物の選択的変性条件とその dioxane 抽出につき検討した。

(イ) o-phenanthroline による好中球および関節液コラーゲナーゼの阻害

<sup>14</sup>C 標識コラーゲンと好中球および関節液コラーゲナーゼの反応液それぞれ 0.4 ml に、80 mM o-phenanthroline 溶液を 0~4 mM となるように加え、35℃、2 時間反応後、室温にてそれぞれ等量の dioxane お

Collagen solution	Final concentration of dioxane		
	30%	35%	50%
Native collagen (400 μg)*	13 cpm	7 cpm	7 cpm
Denatured collagen (400 μg)*	470	495	480
+ leucocyte extract 100 μl**	—	—	490
+ synovial fluid 50 μl	500	489	235
+ synovial fluid 100 μl	481	482	—

\* 480 cpm/400 μg, \*\* protein 300 μg/100 μl

表 1 <sup>14</sup>C 標識変性コラーゲンの各種濃度 dioxane 抽出に対する白血球抽出物および関節液の影響

白血球抽出物(蛋白として 300 μg) と RA 患者関節液 50 および 100 μl をそれぞれ加えた

0.4 ml の 0.1% <sup>14</sup>C 標識コラーゲン溶液 (pH 7.8) に表に示した濃度となるよう各々等量の 60, 70 および 100% dioxane を加え、激しく攪拌後、6000 rpm で 10 分間遠沈し、上清中に抽出された放射活性を測定した。

よび70% dioxane を加え、上清に抽出された放射活性を測定した。その結果、両酵素とも、オタマジャクシコラーゲナーゼ<sup>7)</sup>と同様に1 mM o-phenanthroline によりその活性が阻害されることが明らかとなった。(図1)。

(ロ) 好中球および関節液コラーゲナーゼによるコラーゲン分解産物の35℃における変性とその dioxane 抽出

好中球および関節液コラーゲナーゼを25℃および35℃で<sup>14</sup>C 標識コラーゲンと反応し、20 μl の80 mM o-phenanthroline を加え反応を停止後、35℃で0~120分 incubation し、室温にておのおの dioxane 濃度50%および35%となるよう dioxane および70% dioxane を等量加え、上清中に抽出された放射活性を測定した。その結果、両酵素によるコラーゲン分解産物はオタマジャクシコラーゲナーゼによる分解産物と同様、<sup>7)</sup> 反応温度25℃では60分、35℃の時は約30分の35℃ incubation でほぼ完全に変性し、それぞれ50%、35% dioxane 上清中に抽出された(図2-a, b)

また、両酵素を25℃で一昼夜コラーゲンと反応し、反応停止後、35℃で60分、分解産物を変性し、それぞれ50%および35% dioxane 抽出した上清と沈澱画分の disk 電気泳動像を図3に示した。この結果、両コラーゲナーゼによるコラーゲン分解産物はそれぞ

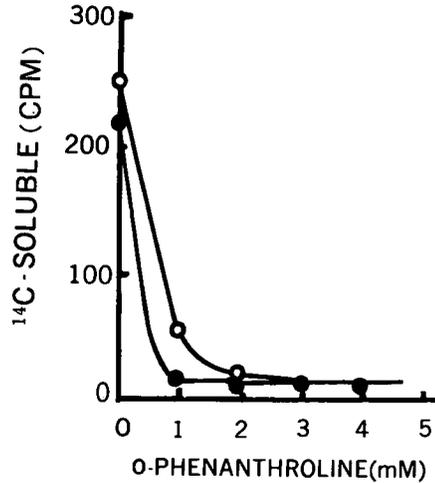


図1 o-phenanthroline による好中球および関節液コラーゲナーゼの阻害

白血球抽出物100 μl (●)および3 M KI 処理関節液50 μl (○)と400 μgの<sup>14</sup>C 標識コラーゲンを最終濃度0~4 mM となるように o-phenanthroline を添加した0.05 M Tris-NaCl-CaCl<sub>2</sub>-glucose 緩衝液中で35℃、2時間反応後、室温にてそれぞれ最終濃度50%および35%となるように100% dioxane および70% dioxane を等量加え、表1に示したのと同様に、上清に抽出された放射活性を測定した。

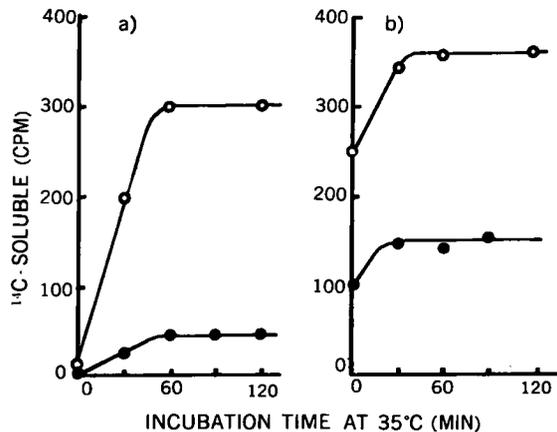


図2 好中球および関節液コラーゲナーゼによるコラーゲン分解産物の35℃における変性

<sup>14</sup>C 標識コラーゲン (480 cpm/400 μg) と好中球 (●) および関節液コラーゲナーゼ (○) をそれぞれ25℃で22時間 (a)、35℃で1時間 (b) 反応し、20 μl の80 mM o-phenanthroline 溶液を添加して反応を停止後、35℃で0~120分間 incubation し、室温に冷却後、前者は50%、後者は35%となるよう dioxane を加え、上清に抽出された放射活性を測定した。

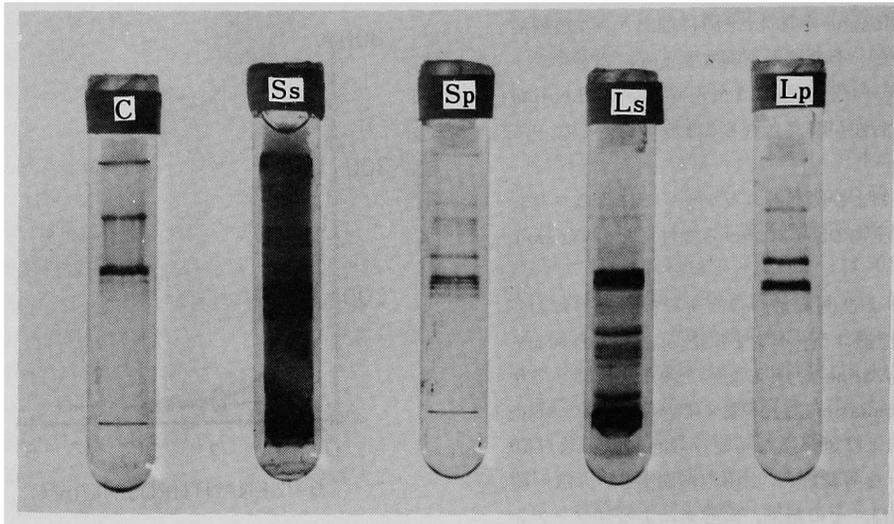


図3 好中球および関節液コラーゲナーゼ反応液の dioxane 抽出上清および沈澱画分の disk 電気泳動 pattern

400  $\mu\text{g}$  の  $^{14}\text{C}$  標識コラーゲンと好中球および関節液コラーゲナーゼをそれぞれ 25 $^{\circ}\text{C}$ , 24 時間反応し, o-phenanthroline で反応を停止後, 35 $^{\circ}\text{C}$  で 1 時間, 分解産物を変性し, 図 2 に示したと同様に, それぞれ 50%, 35% dioxane 抽出を行なった. 沈澱画分は 0.4 ml の pH 4.0, glycine-酢酸緩衝液に溶解後, 45 $^{\circ}\text{C}$ , 10 分間変性し, また上清画分はそのまま dioxane を除去せずに disk 電気泳動を行なった.

C: コントロール, S<sub>s</sub>: 関節液-上清, S<sub>p</sub>: 関節液-沈澱,

L<sub>s</sub>: 好中球-上清, L<sub>p</sub>: 好中球-沈澱

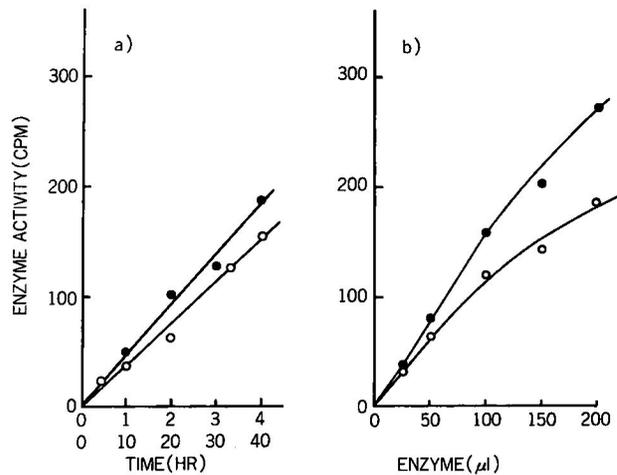


図4 ゲル法と溶液法による好中球コラーゲナーゼ活性の比較

a) 50  $\mu\text{l}$  の白血球抽出物を用い, 35 $^{\circ}\text{C}$  で溶液法(●)は 1~4 時間, ゲル法(○)は 5~40 時間それぞれ反応した. b) 25~200  $\mu\text{l}$  の白血球抽出物を用い, 35 $^{\circ}\text{C}$  で溶液法(●)は 2 時間, ゲル法(○)は 20 時間それぞれ反応した.

れ選択的に最終濃度 50% および 35% dioxane により抽出されることが明らかとなった。

(3) 溶液法とゲル法による好中球および関節液コラゲナーゼ活性の比較

以上述べてきたごとく、<sup>14</sup>C 標識可溶性コラゲンを基質とし、その分解産物を好中球の場合は 50% dioxane、関節液の場合は 35% dioxane に抽出することにより、両コラゲナーゼ活性を溶液法により測定できることが明らかとなった(実験方法の項参照)。そこで、好中球および関節液コラゲナーゼ活性を溶液法とゲル法によりそれぞれ測定し比較した。その結果は図 4 および図 5 に示す。両酵素ともオタマジャクシコラゲナーゼ<sup>2)</sup>の場合と同様に、溶液法はゲル法に比し、反応速度は約 10 倍大きく、さらに酵素量と酵素活性が直線性となる範囲も広がった。

とくに関節液コラゲナーゼ活性を測定する場合、関節液の粘性が非常に高いため、ゲル法では反応液が均一に混合されにくく、コラゲナーゼのコラゲンゲル中への拡散は不均一でしかも遅いため、その活性測定値は図 5 に示したように大きな誤差を生じ、正確に測定することは困難であった。これに対し、溶液法では、均一な反応を行ないやすく、ゲル法に

比しその測定値のバラツキは少なかった。

しかし、可溶性コラゲンを基質とした溶液法により組織中のコラゲナーゼ活性を測定する場合、組織に含まれるコラゲナーゼ以外の中性 protease 類の影響を無視できない可能性もある。溶液法によるコラゲナーゼ活性測定がこれらの中性 protease 類により影響をうけるか否かを明らかにするため、コラゲナーゼ以外の中性 protease が含まれていることが知られている<sup>14, 15)</sup>好中球抽出物について、37 例を無作為に選択し、そのコラゲナーゼ活性をゲル法と溶液法により測定し比較した。その結果、両方

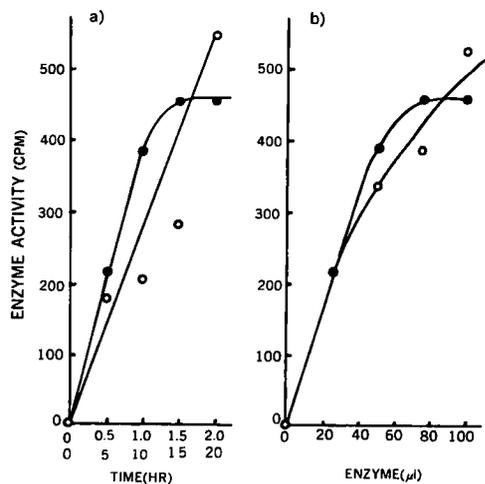


図 5 ゲル法と溶液法による関節液コラゲナーゼ活性の比較

a) 25 μl の KI 処理関節液を用い、35°C で溶液法(●)は 0.5~2 時間、ゲル法(○)は 5~20 時間それぞれ反応した。b) 25~100 μl の関節液を用い、35°C で溶液法(●)は 0.5 時間、ゲル法(○)は 5 時間それぞれ反応した。

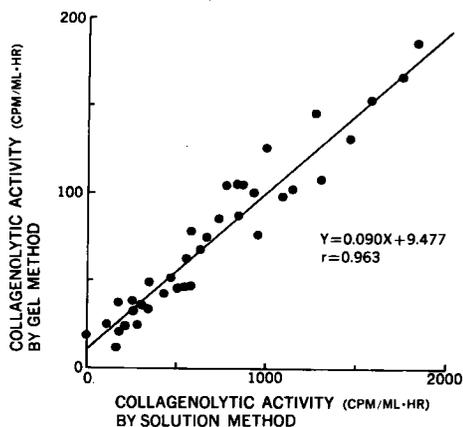


図 6 ゲル法と溶液法による好中球コラゲナーゼ活性の相関性

任意に選択した 37 例の好中球抽出物 50~100 μl を用い、ゲル法は 30~40 時間、溶液法は 2~3 時間反応を行なった。

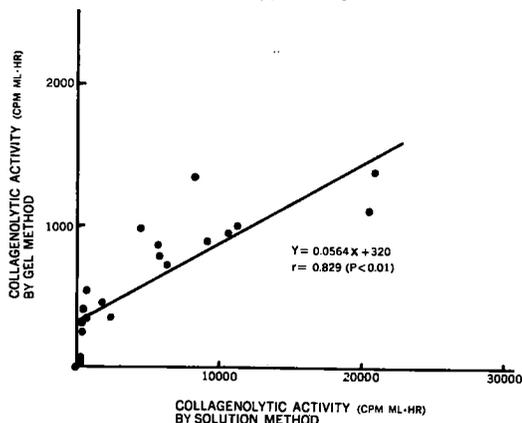


図 7 ゲル法と溶液法による関節液コラゲナーゼ活性の相関性

3 M KI 処理した RA および OA 患者関節液 (25~50 μl) を用い、ゲル法は 5~40 時間、溶液法は 0.5~4 時間、35°C で反応を行なった。

法により測定したコラゲナーゼ活性は図6に示したごとく、相関係数  $r$  は 0.997, 危険率 1% 以内で有意に正の相関を示し, 溶液法はゲル法と同じ高い特異性をもったコラゲナーゼ活性の測定法であることが明らかとなった。

同様に, KI 処理により活性化した RA および OA 患者関節液コラゲナーゼ活性をゲル法と溶液法で測定し比較した。その結果は図7に示したごとく, 両方法により測定したコラゲナーゼ活性は, 相関係数  $r$  は 0.829, 危険率 1% 以内で相関性はみとめられたが, 好中球コラゲナーゼの場合と異なり, 変動巾が大きかった。これは前述したように, ゲル法による関節液コラゲナーゼ活性の測定値の変動巾が大きいことによるためと思われる。さらに, 溶液法において活性が低く測定される試料が, ゲル法において比較的高く活性が測定される傾向があることから, ゲル法では反応時間が長いこと, 何らかの要因により反応中に残存する不活性化型コラゲナーゼの活性化が起っているのか, または, 非特異的なコラーゲン線維の溶解が起っているとも考えられる。

以上述べてきたごとく, 溶液法はゲル法に比し, 単に反応時間を 10 分の 1 に短縮することができるのみでなく, より正確に好中球および関節液コラゲナーゼ活性を測定できる特異性の高いコラゲナーゼ活性測定法であることが明らかとなった。そこで, 本方法を用い, 各種疾患患者より得た好中球および関節液中のコラゲナーゼ活性を測定した。

#### (4) 各種疾患患者好中球中のコラゲナーゼ活性の変動

好中球コラゲナーゼに関しては, その結合組織代謝における意義や炎症性疾患における役割りは現在のところまったく解明されていない。そこで, 今後この好中球コラゲナーゼの存在意義や病理的状态における役割りなどを明らかにするため, 予備試験として, 正常人 18 名, 糖尿病 (以下 DM と略す) 患者 29 名, 全身性エリテマトーデス (以下 SLE と略す) 患者 9 名および RA 患者 17 名につき, 好中球コラゲナーゼ活性を溶液法を用いて測定し, 疾患別に比較した。なお, 好中球分離操作中, 明らかに白血球以外の血液成分の夾雑が認められる試料を除外するため, 血液中の全白血球数と分離した白血球より抽出された蛋白量が図8に示した範囲内に入るもののみにつき, コラゲナーゼ活性を測定し, 単位蛋白量当りの活性で示した。

結果は図9に示したごとく, 各群内における変動

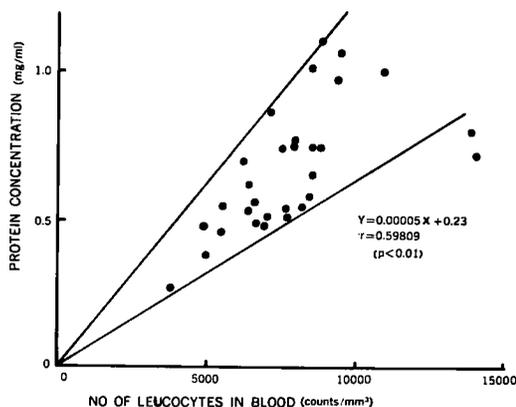


図8 血液中の白血球数と分離した白血球から抽出される蛋白量の相関性

正常人および各種疾患患者から得たヘパリン加新鮮血 5 ml より白血球を分離し, 明らかに赤血球の夾雑のないもの 31 例を任意に選択し, 1.5 ml の 0.05 M Tris-NaCl-CaCl<sub>2</sub> を加え, 3 回凍結融解をくり返し, 10,000 g で 10 分間遠沈を行ない, 上清中に抽出された蛋白量を測定し, 血液中の全白血球数と比較した。

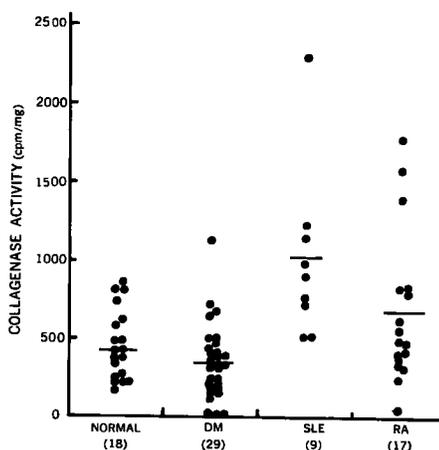


図9 各種疾患患者好中球コラゲナーゼ活性の変動

血液 5 ml より分離した白血球からの抽出蛋白量が図8に示した範囲内にあるもののみについて, 抽出液 100  $\mu$ l を用い, 35°C で 2~3 時間反応し, 単位蛋白量当りの活性で示した。

巾は非常に大きく, 正常人では  $482 \pm 216$  (Mean  $\pm$  S. D. 以下同じ), DM 患者は  $350 \pm 246$ , RA 患者は  $680 \pm 481$  cpm/mg $\cdot$ hr で, DM 患者ではやや低く, RA 患者では逆にやや高い傾向がみとめられたが, 統計的に有意の差はなかった。しかし, SLE 患者で

は、 $1026 \pm 534$  cpm/mg·hr で危険率 1% 以内で正常人より有意に高いコラゲナーゼ活性がみとめられた。

(5) RA および OA 患者関節液中の活性型および不活性型コラゲナーゼ含量の変動

RA 患者関節液中には、活性型コラゲナーゼの他に、潜在型コラゲナーゼといわれる不活性型コラゲナーゼが多量に含まれていることが知られている。<sup>5,16)</sup>

これらのコラゲナーゼの RA および OA における特異性とその変動を明らかにするため、RA stage I, II, III および IV の患者計 15 例と OA 6 例につき、関節液中の活性型および不活性型コラゲナーゼ含量の変動を、溶液法とゲル法を用い測定し比較した。

活性型コラゲナーゼは、関節液を 0.05 M Tris-NaCl-CaCl<sub>2</sub> に一昼夜透析したものの 50 μl を用い、ま

RA Stage	Subject	Sex & Age	Date of aspiration	RA-CRP test		ESR 1 hr/2 hr	WBC count/mm <sup>3</sup>	Yrs after onset	Collagenase activity (cpm/ml·hr)		
				(+)	(-)				untreated	treated with 3 M KI	
I	M. M	42 F	75. 4. 1	(+)	(-)	/	4900	9	0* (1)**	410* (480)**	
II	H. M	58 F	75. 2. /	/	/	/	/		25 (3)	20960 (1390)	
			2. 27	5 +	1 +	115	20300	70 (2)	5800 (780)		
			3. 12	5 +	1 +	115	20200	65 (5)	20480 (1110)		
			4. 1	3 +	2 +	115	13500	80 (7)	9040 (890)		
II	A. K	49 F	75. 2. 2	4 +	1 +	120	20700	70 (3)	10640 (940)		
			4. 22	3 +	1 +	34	/	0 (0)	0 (0)		
			75. 2. 20	1 +	2 +	89	14100	55 (3)	1360 (340)		
III	Y. S	53 F	75. 2. 27	1 +	2 +	89	31300	16	50 (6)	5600 (860)	
			4. 22	2 +	2 +	47	47000	130 (2)	1840 (430)		
			75. 1. 29	2 +	2 +	67/101	31700	5	/ (✓)	4320 ( / )	
	H. K	51 F	75. 2. 11	4 +	1 +	27	27000		0 (0)	2910 (320)	
			2. 13	4 +	1 +	27	37000	8	0 (0)	510 (21)	
	S. T	57 F	75. 4. 15	2. 18	4 +	1 +	27	67000		66 (0)	440 (320)
				75. 1. 30	3 +	(-)	78	10900	14	110 (2)	480 (260)
	M. K	72 F	75. 1. 30	2. 6	3 +	1 +	64	/	7	0 (0)	160 (160)
				75. 2. 6	3 +	1 +	64	30000		0 (0)	0 (0)
	Y. N	41 F	75. 2. 6	75. 2. 6	2 +	2 +	95/125	21800	8	0 (0)	160 (0)
75. 2. 18				(-)	2 +	53	40000	11	320 (5)	720 (550)	
IV	Y. M	52 F	75. 3. 5	4 +	1 +	83	26500		40 (3)	680 (350)	
			3. 26	4 +	1 +	83	62000	23	30 (11)	8320 (1350)	
			4. 1	4 +	1 +	100	29300		30 (3)	4620 (990)	
			4. 8	4 +	1 +	100	/		90 (0)	320 (16)	
	K. S	30 F	75. 2. 27	3 +	(+)	100	15100	4	65 (22)	11200 (990)	
	A. I	57 F	75. 2. 6	2 +	2 +	103/126	65500	8	0 (0)	4350 ( / )	
	H. Y	46 M	75. 2. 20	2 +	2 +	32	14000	8	80 (6)	640 (71)	
H. H	51 F	75. 2. 6	(-)	(-)	30/65	19200	8	0 (0)	290 (0)		
OA	Y. M	62 M	75. 1. 30	2 +	(-)	46	400		0 (0)	96 (0)	
			2. 6	2 +	(-)	46	2500	2	0 (0)	160 (13)	
			3. 5	2 +	(-)	46	16300		0 (0)	290 (0)	
	T. S	73 M	75. 3. 5	2 +	(-)	57	12600	6	16 (10)	3120 (710)	
	M. F	80 F	75. 4. 22	1 +	(-)	22	(-)	2	70 (0)	3440 (470)	
	M. S	44 M	75. 3. 9	/	/	/	(-)	1	35 (0)	280 (51)	
	Y. F	46 F	75. 4. 11	(-)	(+)	22	(-)	1	50 (17)	40 (11)	
Y. H	72 F	75. 2. 13	/	/	29	200	5	0 (0)	0 (0)		

\* solution method \*\* gel method

表 2 RA および OA 患者関節液中の活性型および不活性型コラゲナーゼ含量

RA および OA 患者より採取した関節液を 3 M KI 処理により活性化する前と後で、コラゲナーゼ活性の変化をみた。溶液法では 50 μl の関節液を用い、35°C で 0.5~2 時間、ゲル法では 5~20 時間反応した。

た、不活性コラゲナーゼは関節液を3M KI溶液に4℃、20時間透析し活性化したのちその50 $\mu$ lを用い測定した。なお、KI処理により活性化されるコラゲナーゼの割合は常に一定とはならないため、各試料は使用まで-20℃で保存しておき、同時にまとめてKI処理を行なった。

結果は表2に示したごとく、KI処理前ではRAもOAもその関節液中には明確なコラゲナーゼ活性を溶液法でもゲル法でもみとめられなかった。これに対し、KI処理により、大部分のRA患者関節液中に溶液法でもゲル法でも著しいコラゲナーゼ活性の増加がみとめられた。またOAでも、6例中2例に著明なコラゲナーゼ活性の増加がみとめられた。

RA患者関節液中のKI処理により活性化される不活性型(潜在型)コラゲナーゼ含量は、永井が報告しているように<sup>16)</sup> RA stageの若い時期ほど多いと推定はされるが、表2に示したごとく、stage I~IIの患者関節液中にほとんど不活性型コラゲナーゼの蓄積がみとめられない症例があるのに対し、逆にstage IVの患者関節液中に多量にみとめられる場合もあった。さらに、同一患者でも関節液採取日により、そこに含まれる不活性型コラゲナーゼ含量に著しい差がみとめられた。この不活性型コラゲナーゼ含量は、個々の患者の全身および局所の炎症症状、すなわち、CRP、血沈および関節液中の白血球数などほぼ対応しており、炎症症状の激しい時期に高いことが推定された。以上のことから、関節液中の不活性型コラゲナーゼはRAに多くみとめられるものの、RAに特異的なものではなく、またRAのstageの相違により本質的な差のあるものでもなく、全身および局所の炎症症状の激しい時期に関節液中に多量に蓄積されることが推察された。一方、関節液中の不活性型コラゲナーゼ含量は著明な変化があるにもかかわらず、それに対応した活性型コラゲナーゼ含量の変化はまったくみとめられず、関節液における不活性型から活性型コラゲナーゼへの変換は明らかではなかった。

## V 考 察

<sup>14</sup>C標識可溶性コラーゲンを基質とした溶液反応によるコラゲナーゼ活性測定法(溶液法)をヒト好中球および関節液コラゲナーゼ活性測定に適用した。その結果、コラゲナーゼによるコラーゲン分解産物の抽出条件をかえることにより、組織が異なり、そこに含まれるproteaseをも含めた夾雑物の異なる

上記2種のコラゲナーゼ活性を従来使用されてきたゲル法と同様、特異的にしかもより正確に短時間で測定できることが明らかとなった。特に関節液は粘性が非常に高く、含まれる夾雑物も多いため、ゲル法により正確に活性を測定することが困難である。同様に溶液法においても、コラーゲン分解産物は多量に存在する関節液成分と50% dioxane抽出時に共沈し、定量的に抽出されなかった。しかしながら、反応液0.4ml中、酵素溶液として関節液は100 $\mu$ l以下の量を用い、コラーゲン分解産物の抽出を最終濃度30~35%のdioxaneにより行なうことにより、定量的に分解産物を抽出することができた。

この溶液法を用い、各種疾患患者好中球および関節液コラゲナーゼ活性を測定しゲル法と比較した。

Lazarusら<sup>10)</sup>は、好中球コラゲナーゼは可溶性コラーゲンを分解するが、線維性コラーゲンに対する親和性が弱く、この酵素が働くためには線維性コラーゲンを可溶化する補助酵素を必要とし、他のコラゲナーゼとまったくその性質が異なると述べている。しかし、線維性コラーゲンと可溶性コラーゲンをそれぞれ基質とするゲル法と溶液法による好中球コラゲナーゼの反応速度の比は1:10で、オタマジャクシ<sup>11)</sup>および関節液コラゲナーゼの反応測度の比と同じであることから、好中球コラゲナーゼの線維性コラーゲンに対する親和性は、他の組織コラゲナーゼと異なるものではないことが明らかとなった。

また、各種疾患患者好中球コラゲナーゼ活性を測定した結果、各疾患群内での活性のパラッキの範囲は非常に大きいにもかかわらず、SLEでは正常人に比し有意にその活性が高く、さらにRAにおいても活性の高い症例がみとめられ(図9)、これらの炎症性疾患において、好中球コラゲナーゼが何らかの結合組織の炎症性代謝異常に関与しているのではないかと考えられた。このことは、Arthus型アレルギー疾患や血清病(serum sickness)の動脈炎における血管基底膜の分解に好中球が関与していること<sup>12)</sup>さらに、好中球抽出物がヒト腎の基底膜やウサギの皮膚血管壁に障害を起すこと<sup>14)</sup>などからも、immuno complex lesionとしてのアレルギー性組織障害との関連性が示唆される。いいかえれば、好中球コラゲナーゼも他の組織コラゲナーゼと同様に、生理的および病理的状態において、何らかの制御を受けつつ、結合組織の代謝に関与している可能性があるものと思われる。

今回の成績では、各疾患群におけるコラゲナーゼ

活性の変動巾が大きい結果が得られた。この原因の一つとして、コラゲナーゼ活性を好中球単位数当りの活性で示し得なかったためである可能性がある。しかしながら、今回白血球分離に用いた塩化アンモニウム溶液を用いる溶血法は好中球を分離するのに適した方法であり、リンパ球は好中球に比し、破壊されやすく、分離前の好中球比率50~60%のものが、分離後は80~90%に上る<sup>21)</sup>さらに、今回用いた各疾患患者の白血球百分率も好中球はほぼ50~70%と正常人と大差なく、好中球比率の変動がコラゲナーゼ活性変動の主原因とは考えられない。

一方、白血球が異物を貪食する際に活性型コラゲナーゼが細胞から放出されること<sup>19)</sup>化学物質<sup>1)</sup>や生体成分(関節液)<sup>19)</sup>により好中球コラゲナーゼの活性化が起ること、その逆に、好中球の細胞質中にはコラゲナーゼをも含めた各種中性 protease を阻害する物質が含まれていること<sup>20)</sup>などが最近明らかにされた。上述のこれらの要因が、好中球抽出物中のコラゲナーゼ活性の各疾患群内における変動巾の大きい原因になっているとも考えられた。そこで、好中球抽出物中のコラゲナーゼ活性と pH 8.0 における casein 分解活性を任意に選択した 51 例について比較したところ、両酵素活性は相関係数  $r$  は 0.7455,  $p < 0.01$  で有意に正の相関を示した。すなわち、両酵素とも、細胞質中に存在する共通の阻害物質<sup>20)</sup>によりその活性が規制されているものと考えられた。従って、図 9 に示した各疾患患者好中球コラゲナーゼ活性変動の主原因は、好中球中の阻害物質含量の差によるものと推定される。

以上のことから、好中球コラゲナーゼの生理的および病理的な結合組織の代謝における役割りを明らかにしていくためには、好中球単位当りのコラゲナーゼ活性の変動を明らかにすると同時に、活性型と不活性型コラゲナーゼ含量の比、およびコラゲナーゼ含量とその阻害物質の量比などをまず明らかにする必要があると考えられる。

さらに、各組織コラゲナーゼ活性の発現は、各種ステロイドホルモンにより大きく影響を受けること、<sup>21, 22, 23)</sup>また、好中球コラゲナーゼは各種の非ステロイド系抗炎症剤により直接阻害を受けること<sup>24)</sup>などが知られている。このため SLE や RA 患者好中球にみられる高いコラゲナーゼ活性が、それらの疾患の本質によるためか、逆に薬物により本来の活性よりも低くおさえられているのか否かを、とくに好中球細胞質中のコラゲナーゼ阻害物質との関係において明

らかにする必要がある。今後の多数症例についての臨床的検討が望まれる。

RA における軟骨や骨破壊が、関節組織におけるコラゲナーゼ活性の異常亢進に起因することは、RA 患者関節液中に直接コラゲナーゼ活性がみとめられること<sup>4)</sup>や、3 M NaI または NaSCN により活性化されるいわゆる潜在型 (Latent form) コラゲナーゼと呼ばれる不活性型コラゲナーゼが多量に蓄積されていること<sup>5)</sup>からも明らかである。この潜在型コラゲナーゼには、血清由来の  $\alpha_2$ -macroglobulin<sup>5)</sup> と結合組織構成高分子の代謝産物と推定される低分子物質 (X 因子)<sup>6, 16)</sup> と結合した 2 種の不活性型コラゲナーゼが知られており、これらの関節液中における比率は RA の stage や罹患年数により変化すると云われている。<sup>16, 25)</sup>一方、OA 患者関節液中にも RA と同様に潜在型コラゲナーゼが存在するが、その量や検出頻度は RA に比して小さく<sup>5)</sup> RA と OA の診断上の一つの指標となり得る可能性が示唆されている。

しかし、今回、RA stage I~IV の患者関節液中の 3 M KI により活性化される不活性型コラゲナーゼ含量の経日変化をみた結果、表 2 に示したごとく、その経日変化は著しく、RA stage が若いからといって常に関節液中のコラゲナーゼ含量が多いとは云えないことが明らかとなった。すなわち、関節液中の不活性型コラゲナーゼは RA の stage より各患者の全身性および局所の炎症症状とより密接に関係し、増減していることが推察された。このことは、OA 患者関節液中にも RA と同程度の不活性型コラゲナーゼが存在していることから推察される。いいかえるならば、関節液中の不活性型コラゲナーゼの存在は、けっして RA に特異的なものではなく、関節組織における結合組織の分解を伴う一般的炎症症状と関係しているものと考えられる。

関節液中の 2 種の不活性型コラゲナーゼのうち、 $\alpha_2$ -macroglobulin との結合型は、低分子物質との結合型コラゲナーゼに比し、3 M NaI により活性化される割合が著しく小さい。<sup>25)</sup>このため、表 2 に示した各患者関節液中の 3 M KI 処理後、測定されたコラゲナーゼ活性は主に低分子物質と結合したコラゲナーゼ量を示しているものと考えられる。この低分子物質結合型コラゲナーゼは、chick embryo の皮膚を組織培養した時に得られる不活性型コラゲナーゼとその分子量および 3 M NaI による活性化の挙動がよく似ており<sup>9)</sup> コラゲナーゼ産生細胞から分泌されたままの未変化の proenzyme である可能性が

示唆されている。しかし、表2に示したごとく、関節液中のこの不活性型コラーゲン含量に著しく変化がみとめられるのにもかかわらず、それに対応した活性型コラーゲン量は全例でほとんど変化がみられなかった。すなわち、永井ら<sup>6,16)</sup>の想定しているような、関節液中において、不活性型コラーゲンが活性型へ変換されると思われる事実をみいだすことはできなかった。しかしながら、コラーゲンの産生およびその活性発現は、前述したように各種のステロイドホルモンや薬物によって大きな影響を受けていると考えられ、関節液中の不活性型コラーゲンが、*in vivo*で活性化されるのか否かについてはさらに詳細な検討が必要と思われる。

また、 $\alpha_2$ -macroglobulin と結合したコラーゲンは、関節組織において異常産生または異常分泌された活性型コラーゲンが、炎症に伴う血管透過性の亢進により浸出した血清中の  $\alpha_2$ -macroglobulin と結合し、不活性型酵素として関節液中に蓄積され、代謝分解されていく過程のものであると考えられる。

したがって、*in vitro*において3M NaI や KI 等により活性化されることのみから、関節液中の不活性型コラーゲンが、*in vivo*においても活性化される潜在型のコラーゲンであるとは云えない。

さらに、関節液中には、コラーゲンよりもはるかに多量の  $\alpha_2$ -macroglobulin が存在し、 $\alpha_2$ -macroglobulin とコラーゲンの親和力はコラーゲンとコラーゲンの親和力よりも強いことが明らかとなっている。<sup>16)</sup>従って、関節液中の不活性型コラーゲンが活性化された場合は、ただちに多量に存在する  $\alpha_2$ -macroglobulin と結合するものと考えられ、いかにして活性型のまま基質である関節の結合組織に到達し、その分解に関与することができるのか説明がつかない。

以上述べてきたごとく、関節液中の不活性型コラーゲンはたして真の潜在型コラーゲンであるか否かについては、今後の生化学および臨床領域における詳細な検討が必要と思われる。

## VI 結 語

1) <sup>14</sup>C 標識可溶性コラーゲンを基質とした溶液法を好中球および関節液コラーゲン活性測定に応用した。その結果、好中球コラーゲンはオタマジャクシコラーゲンと同様に測定することができた。しかし、関節液コラーゲンに関しては、夾雑物が多量に含まれているため、<sup>14</sup>C 標識コラーゲンの分解

産物の抽出は、最終濃度50% dioxane のかわりに、35% dioxane を用いることにより、測定することが可能となった。

2) <sup>14</sup>C 標識コラーゲンの再生線維を基質とする従来のゲル法と溶液法を比較した結果、好中球コラーゲンも関節液コラーゲンもその反応速度の比は1:10で、オタマジャクシコラーゲンと同じく、これらのコラーゲンの線維性コラーゲンと可溶性コラーゲンに対する親和度が等しく、これらの酵素の特性はよく似ていることが推察された。

3) 種々の protease をも含めた夾雑物を含む好中球および関節液コラーゲンをそれぞれ溶液法とゲル法で測定し比較した結果、両者はそれぞれ危険率1%以内、相関係数 *r* は0.963および0.829でよく相関し、溶液法はゲル法におとらない特異性の高いコラーゲン活性測定法であることが明らかとなった。

4) 溶液法を用い、各種疾患患者好中球中のコラーゲン活性の変動をみた結果、糖尿病のそれは正常人とほとんどかわらなかったが、RA では正常人より活性の高い例がみられ、さらにSLEでは正常人群より有意にコラーゲン活性が増加していることがみとめられた。

5) 同様に、RA および OA 患者関節液中のコラーゲン活性を、3MKI 活性化処理前と後で測定した。その結果、潜在型コラーゲンといわれる不活性型コラーゲンはすべての stage (I~IV) の RA 患者および OA 患者関節液中にもみとめられ、RA に特異的なものではないことが明らかとなった。また RA 関節液中のその含量は同一患者でも、日によって大きな変動があるにもかかわらず、活性型コラーゲンは全例にほとんどみとめられず、不活性型コラーゲンの活性型コラーゲンへの変換は明らかではなかった。

## 謝 辞

本研究の遂行に当り、御指導ならびに御校閲を賜りました恩師大藤真教授ならびに山本伸郎博士に深謝致します。また、直接御指導下さいました河西浩一講師はじめ、教室員各位に感謝致します。

また、長年に亘り御教示下さり、研究の機会を与えて下さった東京医科歯科大学・難治疾患研究所、永井裕教授ならびに御協力いただいた堀久枝氏に深謝致します。

## 文 献

- 1) Harris, E. D. Jr. and Krane, S. M. : Collagenase.  
New Eng. J. Med., **291**, 557—563, 1974.  
    ibid           **291**, 605—609, 1974.  
    ibid           **291**, 652—661, 1974.
- 2) Montfort, I. and Pérez-Tamayo, R. : The Distribution of Collagenase in Normal Rat Tissues.  
J. Histochem. Cytochem., **23**, 910—920, 1975.
- 3) Robertson, P. B., Ryel, R. B., Taylor, R. E., Shyu, K. W. and Fullmer, H. M. : Collagenase  
: Localization in Polymorphonuclear Leucocyte Granules in the Rabbit. Science, **177**, 64—65,  
1972.
- 4) Harris, E. D. Jr., DiBona, D. R. and Krane, S. M. : Collagenases in Human Synovial Fluid.  
J. Clin. Invest., **48**, 2104—2113, 1969.
- 5) Abe, S., Shinmei, M. and Nagai, Y. : Synovial Collagenase and Joint Diseases : The Sig-  
nificance of Latent Collagenase with Special Reference to Rheumatoid Arthritis. J. Biochem.  
(Tokyo), **73**, 1007—1011, 1973.
- 6) Nagai, Y., Hori, H., Kawamoto, T. and Komiya, M. : A Regulation Mechanism of Collagenase  
Activity in vitro and vivo. In Dynamics of Connective Tissue Macromolecules, ed. by P. M. C.  
Burleigh and A. R. Poole. Amer. Elsevier Pub. Co. N. Y., p 171—187, 1975.
- 7) Terato, K., Nagai, Y., Kawanishi, H. and Yamamoto, S. : A Rapid Assay Method of Collagenase  
Activity using <sup>14</sup>C-Labeled Soluble Collagen as Substrate. Biochim. Biophys. Acta, **445**,  
753—762, 1976.
- 8) Nagai, Y., Lapiere, C. M. and Gross, J. : Tadpole Collagenase. Preparation and Purification.  
Biochemistry, **5**, 3123—3130, 1966.
- 9) Nagai, Y. and Hori, H. : Entrapment of Collagen in a Polyacrilamide Matrix and Its Appli-  
cation in the Purification of Animal Collagenase. Biochim. Biophys. Acta, **263**, 564—573,  
1972.
- 10) Daniels, J. R., Lian, J. and Lazarus, G. : Polymorphonuclear Leucocyte Collagenase: Isola-  
tion and Kinetic Characterization. Clin. Res., **17**, 154, 1969.
- 11) Dioguardi, N., Agostoni, A., Fiorelli, G. and Lomanto, B. : Characterization of Lactic De-  
hydrogenase of Normal Human Granulocytes. J. Lab. Clin. Med., **61**, 713—723, 1963.
- 12) Lowry, O. H., Rosebroug, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein Measurement with  
the Folin Phenol Reagents. J. Biol. Chem., **193**, 265—275, 1951.
- 13) Nagai, Y., Gross, J. and Piez, K. A. : Disk Electrophoresis of Collagen Components. An-  
nal. N. Y. Acad. Science, **121**, 495—500, 1964.
- 14) Janoff, A. and Zeligs, J. D. : Vascular Injury and Lysis of Basement Membrane in vitro by  
Neutral Proteases of Human Leucocytes. Science, **161**, 702—704, 1968.
- 15) Folds, J. D., Welsh, I. R. H. and Spitznagel, J. K. : Neutral Proteases Confined to One Class  
of Lysosomes of Human Polymorphonuclear Leucocytes. Pro. Soc. Exp. Biol. Med., **139**,  
461—463, 1972.
- 16) 永井裕 : 慢性関節リウマチにおけるコラゲナーゼの病態生理的関与. リウマチ, **15**, 344—347, 1976.
- 17) Cochrane, C. G. and Aikin, B. S. : Polymorphonuclear Leucocytes in immunologic reactions.  
The Destruction of Vascular Basement Membrane in vivo and in vitro. J. Exp. Med., **124**,  
733—752, 1966.

- 18) Oronsky, A.L., Perper, R.J. and Schroder, H.C.: Phagocytic Release and Activation of Human Leucocyte Procollagenase. *Nature*, **246**, 417—419, 1973.
- 19) Kruze, D. and Wojtecka, E.: Activation of Leucocyte Collagenase Proenzyme by Rheumatoid Synovial Fluid. *Biochim. Biophys. Acta*, **285**, 436—446, 1972.
- 20) Kopitar, M. and Lebez, O.: Intracellular Distribution of Neutral Proteases and Inhibitors in Pig Leucocytes. Isolation of Two Inhibitors of Neutral Protease. *Eur. J. Biochem.*, **56**, 571—581, 1975.
- 21) Weeks, J.G.: Collagenase in the Postpartum Rat Uterus.: Extraction, Characterization, and Mechanism of Inhibition by Estradiol. *Dissertation Abstr. Intern. B*, **35**, 1, 107, 1974.
- 22) Kobb, T.J., Jeffrey, J.J. and Eisen, A.Z.: Regulation of Human Skin Collagenase Activity by Hydrocortisone and Dexamethasone in Organic Culture. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **61**, 1083—1088, 1974.
- 23) Cruess, R.L. and Hong, K.C.: Effect of Cortisone on Collagenolytic Activity in the Rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **148**, 887—890, 1975.
- 24) Wojtecka, L.E. and Dancewicz, A.Z.: Inhibition of Human Leucocyte Collagenase by Some Drugs Used in the Therapy of Rheumatic Diseases. *Biochem. Pharmacol.*, **23**, 2077—2081, 1974.
- 25) 石山嘉宣, 丘松寿, 荒井孝和, 磯部饒, 青池勇雄, 永井裕: 関節液コラゲナーゼからみた慢性関節リウマチおよび変形性骨関節症の病態. 第20回, 日本リウマチ学会総会. 1976.

**A new rapid assay method of collagenase activity  
and its clinical applications**

**Part 2. Determination of collagenase activity in human leucocytes  
and synovial fluids by the newly developed method**

**Kuniaki TERATO**

The Third Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School

(Director : Prof. Tadashi Ofuji)

A newly developed collagenase assay method using  $^{14}\text{C}$ -labeled soluble collagen as substrate has been applied to the determination of collagenase activity in human leucocytes and synovial fluids. The results indicated that collagenase activity in the both samples could be measured by this method as observed with tadpole collagenase, except that 35% dioxane was preferable for the extraction of the enzyme digestion products in the case of synovial fluids. Collagenase activity determined by the present method was well correlated with that obtained by the conventional assay method using reconstituted collagen fibrils as substrate ( $r=0.963$  and  $0.829$  ( $p < 0.01$ ) respectively).

In preliminary experiments with leucocytes from patients with diabetes mellitus (DM), systemic lupus erythematosus (SLE) and rheumatoid arthritis (RA), it was observed that collagenase activity in leucocytes increased significantly in SLE and from some patients with RA, while no appreciable differences were observed in diabetics, compared to that in normals.

In synovial fluids from patients with RA and osteoarthritis (OA), the accumulation of large amount of inactive (latent) form of collagenase was demonstrated by the treatment of synovial fluids with 3M KI. And it was varied significantly in one patient at different time while no appreciable amount of the active form was observed during the period.