



Title	角膜collagenaseに対する金属キレート剤の阻害作用について
Author(s)	奥原, 信一
Citation	大阪大学, 1974, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/31224
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

【 9 】

氏 名 ・ (本籍)	奥 原 信 一
学 位 の 種 類	医 学 博 士
学 位 記 番 号	第 3 1 3 3 号
学位授与の日付	昭 和 49 年 5 月 10 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学 位 論 文 題 目	角膜 collagenase に対する金属キレート剤の 阻害作用について
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 水 川 孝 (副査) 教 授 山 野 俊 雄 教 授 坂 本 幸 哉

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

難治な角膜潰瘍の原因として角膜 collagenase が関与していることが発見されて以来、臨床的には強力な阻害剤の出現が待たれている。最近角膜 collagenase の活性に Ca イオンの他に別の金属 (恐らくは Zn) が必要ではないかということが報告されているが、Ca は角膜にとっても重要な金属で、これを奪う阻害剤は臨床的には用いられない。

著者は Ca とは殆んどキレートしない種々のキレート剤の阻害効果を検討して、それらの阻害機序を解明するとともに臨床的に用いられる阻害剤の開発に寄与しようとする。

〔方法並びに成績〕

直径10mmの円筒につめた綿花に10N 苛性ソーダを十分にしみ込ませ、麻酔下の家兎角膜に20秒間接触させることにより角膜中央に一定のアルカリ腐蝕を起させ2週間後重篤な角膜潰瘍が発生する時期に角膜を切り取り約5mm角の細片に切り刻んで、シャーレの中の適当な高さに固定したステンレス網の上で培養した。培養液には Eagle MEM にペニシリン、ストレプトマイシンおよび50 μ g/ml のファンギゾンを加え5% CO₂ ガス混入の通気中の湿室 (37℃) で行った。毎日培養液を交換するとともに培養液を4℃で限外漏過法により0.05M トリス緩衝液 (pH 7.5) に0.2M NaCl および0.005M CaCl₂ を加えた液に置換濃縮し、Bio Gel P-150 によるカラムクロマトグラフィーを行った。阻害実験にはこのクロマトグラフィーで得られた3つの collagenase 活性の分画 (P-I, P-II, P-III) のうち、分子量45000に相当する部位に現われる最も酵素活性の強い分画を用いた。

また培養液に 1×10^{-6} M の ⁶⁵ZnCl₂ を加えて角膜を培養し、同様の方法でカラムクロマトグラフィー

ーを行い、 ^{65}Zn のピークと酵素活性のピークの一致した分画(P-II)を ^{65}Zn -Collagenaseとして用いた。角膜 collagenase の活性測定には、capillary gel assay 法によった。すなわち、内径 0.6mm のガラス管にラット尻尾から抽出した Tropo collagen (4℃で Sol) を一定の高さまで吸入し両端を歯科用 Wax で封入し 37℃で数時間放置して完全に Gel 化したのち上方の封印を除いて 10 μ l の資料を重畳して再び封印し、37℃で数時間毎に溶解した Gel の長さを測定することにより初期溶解速度を求め mm lysis/hr で表示した。測定にはすべて 3 本を一組として行い、阻害度は対照に対する百分率で示した。阻害剤として EDTA 及び種々の金属により飽和した EDTA 化合物、cysteine 及びその誘導体、Ca とは殆んど結合しないキレート剤などである。最終濃度が所定の濃度になるように阻害剤を collagenase と同じ Buffer に溶解後、pH を 7.5 に調整して collagenase と混合し、室温に 30 分放置したのち capillary gel assay を行った。

1. 充分量の Ca の存在下でも Na_2EDTA 及び CaNa_2EDTA の阻害作用が認められた。

2. ZnNa_2EDTA には $1 \times 10^{-1}\text{M}$ の高濃度でも阻害作用は全く認められず、かえって対照よりも高活性を示す場合があった。

3. EDTA との結合の安定度定数が Ca (10.85) よりも高く Zn (16.69) よりも低い金属で飽和された EDTA 化合物は CoNa_2EDTA を除いてすべて角膜 collagenase を阻害した。

4. Cysteine 及びその誘導体の阻害では SH 基をマスクした場合では阻害作用は認められず、 NH_2 基及び COOH 基をマスクした場合には阻害が認められた。阻害の認められた誘導体の Zn との結合の安定度定数は 8 以上であった。

5. Ca とは結合せず Zn と強く結合するキレート剤に阻害作用を認めた。

6. ^{65}Zn -collagenase に $\text{Ca-Na}_2\text{EDTA}$, Cysteine, を作用させ、Sephadex G-25 にてカラムクロマトグラフィーを行うと、 $\text{Ca-Na}_2\text{EDTA}$ では 99%, Cysteine では 97%, の ^{65}Zn が collagenase 分画から離れて失活した。更に失活した酵素に ZnCl_2 を加えると再び活性化した。

[総 括]

アルカリ腐蝕後の家兎角膜より分離した角膜 collagenase を用いて、種々の金属キレート剤の阻害効果を検討した結果、

1. 活性に必要とされている充分量の Ca の存在下でも角膜 collagenase は阻害を受けた。

2. ZnNa_2EDTA では全く阻害作用は認められず、EDTA との安定度定数が Zn よりも低い金属で飽和された EDTA 金属化合物では阻害作用が認められた。

3. Cysteine 及びその誘導体の阻害作用は、SH 基による Zn との結合によると考えられた。

4. ^{65}Zn -collagenase を用いた実験で角膜 collagenase の活性は Ca の他に Zn が必要で、Zn との安定度定数の大きいキレート剤が阻害剤として臨床的にも有用であると考えられた。

論文の審査結果の要旨

難治な角膜潰瘍の原因として角膜 collagenase が関与していることが発見されて以来、臨床的には強力な阻害剤の出現が待たれている。

本実験では、角膜の透明性保持に不可欠な Ca^{++} とは殆んどキレートしない種々のキレート剤を用いて、阻害効果を検討し、その機序について知見を得たことについて、意義は高いものと思われる。