

|              |   |
|--------------|---|
| Title        | 角膜潰瘍時にみられるコラーゲン分解酵素の研究  |
| Author(s)    | 額田, 朋経  |
| Citation     | 大阪大学, 1981, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/32957">https://hdl.handle.net/11094/32957</a>   |
| 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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。 |

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

|         |   |
|---------|---|
| 氏名・(本籍) | 額 由 朋 経                                       |
| 学位の種類   | 医 学 博 士                                       |
| 学位記番号   | 第 5 1 5 3 号                                   |
| 学位授与の日付 | 昭 和 56 年 2 月 5 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  | 角膜潰瘍時にみられるコラーゲン分解酵素の研究                        |
| 論文審査委員  | (主査)<br>教授 真鍋 禮三<br>(副査)<br>教授 萩原 文二 教授 佐野 栄春 |

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### [目 的]

角膜潰瘍の発生機序に関しては、角膜コラゲナーゼの活性上昇が密接に関係しているものとして注目され、臨床的にもコラゲナーゼ阻害剤が使用されている。

しかし臨床上治療に最も抵抗する角膜ヘルプス、アルカリ腐蝕といった激しい炎症を伴う角膜潰瘍においては、コラゲナーゼ阻害剤などの治療に抵抗し失明の転帰をとることも稀ではない。角膜は本来無血管組織であるが、激しい炎症を伴う角膜潰瘍においては、角膜実質内に血管が進入し、上皮も血管を伴った病的上皮に変化する。

こうした炎症の場として、角膜潰瘍をとらえると、角膜コラゲナーゼ以外のプロテアーゼが、角膜潰瘍発生に関与している可能性も考えなければならない。そこで本研究は、角膜潰瘍の病態を明確にするため、角膜潰瘍時にみられるコラーゲン分解酵素の動態並びに性質を明らかにすることを目的として行った。

#### [方法ならびに成績]

正常家兎角膜並びに水酸化ナトリウムで腐蝕し、重篤な角膜潰瘍が発生した家兎角膜を切り取り培養し、培養液を濃縮透析後、Sephadex G-200によるゲル濾過、QAE-Sephadex A-25によるイオン交換クロマトグラフィーを行い、酵素の分離精製を行った。

正常角膜については、非活性型酵素の存在も考えられるので、粗酵素液を 3 M NaI で透析した後、Sephadex G-200 でゲル濾過し酵素活性を測定した。

分離精製した酵素について、ディスク電気泳動法によりコラーゲンの分解様式を検討し、Andrews

の方法により分子量測定を行った。さらに各種阻害剤の酵素活性に及ぼす影響を調べた。なお本酵素の活性は全て、Bermanらの capillary gel assay 法で測定した。結果は次のようであった。

1. 正常角膜の培養液には、コラーゲン分解酵素は全く detect されなかった。粗酵素液を 3 MNaI で処理した後のゲル濾過でもコラーゲン分解酵素は detect されなかった。
2. アルカリ腐蝕角膜の培養液には、正常角膜とは異なり、三つの活性画分 (P-I, P-I', P-II) を認めた。
3. QAE Sephadex A-25 によるイオン交換クロマトグラフィーでは、低分子量画分 (P-II) は、樹脂には全く吸着せず素通り画分に活性が認められた。
4. ディスク電気泳動法により、コラーゲンの分解様式を検討したところ、低分子量画分 (P-II) は、脊椎動物コラゲナーゼにみられる特徴的な分解様式を示した。高分子量画分 (P-I, P-I') については、このパターンは認められなかった。
5. 分子量は、P-I 約 350,000, P-I' 約 150,000, P-II 約 40,000 であった。
6. 表 I に示す如く P-I 及び P-I' は P-II と同様 EDTA で阻害を受けたが、PCMB, benzamidine, leupeptin は P-II を阻害せず、P-I 及び P-I' の二つの活性画分のいずれも阻害した。

Table 1. Effect of Various Protease Inhibitors on Corneal Collagenase.

| Compounds   | Concentration                            | Activity |      |      |
|-------------|--|----------|------|------|
|             |  | P-I      | P-I' | P-II |
| Control     | —  | 100%     | 100% | 100% |
| EDTA        | 10 <sup>-3</sup> M                       | —        | —    | 9    |
|             | 10 <sup>-4</sup>                         | 20       | 20   | 44   |
| DFP         | 10 <sup>-2</sup>                         | 0        | 29   | 65   |
|             | 10 <sup>-3</sup>                         | 100      | 86   | 100  |
|             | 10 <sup>-4</sup>                         | 100      | 100  | 100  |
| PMSF        | 10 <sup>-3</sup>                         | 100      | 100  | 100  |
| Benzamidine | 10 <sup>-4</sup>                         | 0        | 0    | 100  |
|             | 10 <sup>-5</sup>                         | 0        | 0    | 100  |
| TPCK        | 10 <sup>-4</sup>                         | 20       | 100  | 100  |
| TLCCK       | 10 <sup>-4</sup>                         | 60       | 100  | 100  |
| Leupeptin   | 10 <sup>-4</sup>                         | 40       | 45   | 100  |
|             | 10 <sup>-5</sup>                         | 60       | 64   | 100  |
| Antipain    | 10 <sup>-4</sup>                         | 80       | 88   | 100  |
| PCMB        | 10 <sup>-4</sup>                         | 0        | 0    | 80   |
|             | 10 <sup>-5</sup>                         | 0        | 0    | 100  |
| *PCMB       | 10 <sup>-5</sup> + CysH 10 <sup>-4</sup> | 0        | 0    |      |

## [総括]

アルカリ腐蝕家兎角膜の培養液には、高分子量画分 (P-I, P-I') と低分子量画分 (P-II) の三種類のコラーゲン分解酵素が存在した。いずれも潰瘍時にのみ detect され、未変性のコラーゲンを分解した。P-II はコラーゲン分子を N 末端より 3/4 の部分で分解することより、脊椎動物コラゲナーゼと考えられ、分子量は約 40,000 であった。高分子量画分は、従来一種類の酵素とされていたが、ゲル濾過による詳細な検討の結果 P-I, P-I' の二つの活性画分にわかれることがわかった。分子量は P-I 約 350,000, P-I' 約 150,000 であった。阻害実験で, PCMB, benzamidine, leupeptin では P-II (コラゲナーゼ) は全く阻害されないのに、P-I 及び P-I' のいずれの活性画分も阻害した。このことより、高分子量画分 (P-I, P-I') は、P-II (コラゲナーゼ) とは別の酵素と考えられる。P-I, P-I', P-II の三つの活性画分は、正常角膜には detect されず、角膜潰瘍時にのみ detect される酵素であるので角膜潰瘍の治療に当ってはコラゲナーゼ以外のこれらの酵素についても充分考慮する必要がある。

## 論文の審査結果の要旨

難治性角膜潰瘍は、コラゲナーゼ阻害剤などによる治療に抵抗し失明の転帰をとるものもまれではない。著者は実験的に起こさせた難治性角膜潰瘍組織の培養液から、分子量約 4 万の組織コラゲナーゼ (P-II) の他に、分子量約 35 万 (P-I) と約 15 万 (P-I') の新しい二種類のコラーゲン分解酵素を分離し、種々の阻害剤による阻害実験、ゲル濾過およびイオン交換クロマトグラフィから、P-I と P-I' は別の酵素であり、P-II ととも全く異なる性質を有することを明らかにした。

このことは角膜潰瘍に関与する酵素が組織コラゲナーゼのみの活性化によるものではなく、他の酵素の活性化にも注目して治療に当らねばならないことを示したもので角膜潰瘍の発症機作に新知見を加えたものであり学位論文としてふさわしいと考える。