

家兎濾過手術後におけるコラーゲン合成活性の検討

渡辺 穰爾, 沢口 昭一, 阿部 春樹

新潟大学医学部眼科学教室

要 約

実験的家兎濾過手術後の創傷治癒過程において重要な役割をもつコラーゲン合成活性を, プロリン4位水酸化酵素 β サブユニット, およびI型プロコラーゲンを指標として免疫組織化学的に観察した。白色家兎眼に線維柱帯切除術を行い, 術後1, 4, 7, 14, 28日の濾過部を10%緩衝ホルマリンで12時間固定した後パラフィン切片を作成し, 濾過部組織における各物質をavidin-biotinylated peroxidase complex法を用いて検出した。濾過部にはプロリン水酸化酵素 β サブユニット, I型プロコラーゲンともに, 術後4日から陽性反応が増加し,

術後7~14日において顕著な反応が認められた。術後28日にはこれらの反応は減少していた。この実験結果から, プロリン水酸化酵素とI型プロコラーゲンの産生亢進時期はほぼ一致しており, 創傷治癒過程の中でコラーゲン合成活性は14日以上長期持続することが確認された。(日眼会誌 99:29-33, 1995)

キーワード: プロリン水酸化酵素, プロコラーゲン, 濾過手術, 創傷治癒

Collagen Synthetic Activity Following Filtration Surgery in Rabbits

Joji Watanabe, Shoichi Sawaguchi and Haruki Abe

Department of Ophthalmology, Niigata University School of Medicine

Abstract

We evaluated collagen synthetic activity, which plays an important role in wound healing, following experimental filtration surgery in rabbits. Collagen synthetic activity was measured by immunohistochemistry for prolyl 4-hydroxylase β -subunit and type I procollagen. Trabeculectomy was performed on albino rabbit eyes, with the filtering site harvested on postoperative days 1, 4, 7, 14, and 28. Samples were fixed with 10% buffered formalin for 12 hours and prepared for paraffin section, and each antigen was detected in filtering site tissue using avidin-biotinylated peroxidase complex. Immunoreaction of

prolyl 4-hydroxylase β -subunit or type I procollagen increased from day 4 to 14 and markedly decreased at day 28. These findings show that prolyl 4-hydroxylase and type I procollagen are markedly produced almost simultaneously, and collagen synthetic activity following filtration surgery continues for over 14 days in the process of wound healing. (J Jpn Ophthalmol Soc 99:29-33, 1995)

Key words: Prolyl 4-hydroxylase, Procollagen, Filtration surgery, Wound healing

I 緒 言

緑内障濾過手術後の濾過部創傷治癒は, 術後眼圧コントロールの成否に大きく関与している¹⁾。濾過手術後に起こる濾過部創傷治癒過程は, Skutaら¹⁾によれば, 術後, 血漿成分や血液細胞の浸潤, フィブリン-フィブロンネクチンマトリックスの形成, 線維芽細胞などの増殖に続いてコラーゲンなどの合成が行われ, 最終的に瘢痕組織となる, とされている。このうちフィブリン, フィブ

ロネクチンの動態については既報で²⁾³⁾, 濾過部における細胞増殖活性については Jampelら⁴⁾の報告および既報⁵⁾などで検討されているが, 濾過部の瘢痕化の中で重要な役割を占めるコラーゲン合成の活性について検討した報告は少なかった。

コラーゲンの代謝は以下のように行われる⁶⁾。DNAから mRNA への転写, mRNA の翻訳によりプロトプロコラーゲンが形成され, その後酵素によるプロリン, リジン残基の水酸化, 糖の添加, 三本鎖ヘリックス化により

別刷請求先: 951 新潟県新潟市旭町通1-757 新潟大学医学部眼科学教室 渡辺 穰爾

(平成6年6月16日受付, 平成6年8月8日改訂受理)

Reprint requests to: Joji Watanabe, M.D. Department of Ophthalmology, Niigata University School of Medicine, 1-757 Asahimachidori, Niigata-shi, Niigata-ken 951, Japan

(Received June 16, 1994 and accepted in revised form August 8, 1994)

プロコラーゲンが形成される。プロコラーゲンは分泌された後、酵素によりアミノおよびカルボキシプロペプチドが切断されてコラーゲン分子となる。コラーゲン分子はコラーゲン線維となり、架橋を形成する。今回の実験では、家兎濾過手術後におけるプロリン4位水酸化酵素およびI型プロコラーゲンを指標として酵素抗体法により検出し、術後のコラーゲン合成活性の変動についての検討を試みた。

II 実験方法

実験対象として、体重3~4 kgの白色家兎10匹10眼を用いた。動物に対する取り扱いには「動物の保護及び管理に関する法律」ならびに「実験動物の使用及び保管等に関する基準」に従った。9匹の家兎に対し、ペントバルビタールナトリウム(ネンブタール®)(20 mg/kg)の耳静脈内投与による全身麻酔と塩酸オキシプロカイン(ペノキシール®)による点眼麻酔を施した後、既報⁹⁾に従い片眼にトラベクトミーに準じた濾過手術を行った。すなわち、耳側上方の結膜を円蓋部付近で切開し、結膜と結膜下組織を角膜輪部まで剝離した後、上直筋耳側の強膜上の血管が分布していない部分に、約6×3 mm大の輪部基底半層強膜弁を作成した。その後、強膜角膜移行部で前房側の強角膜を約3×1 mm大に切除した。強膜弁の頂点を10-0プロリン®で強膜に2か所縫合し、結膜を9-0ナイロンで連続結合した。術後抗生物質の筋肉内注射および眼軟膏投与を行った。残りの1匹については手術を行わず、非手術家兎とした。

非手術家兎および術後1, 4, 7, 14, 28日の家兎をペントバルビタールナトリウム(ネンブタール®)の大量静脈内投与により屠殺した。眼球摘出後、強膜および濾過部強膜弁部分を採取し、10%緩衝ホルマリン(pH 7.2)で12時間固定した後、6 μmのパラフィン切片を作成した。

プロリン水酸化酵素およびプロコラーゲンの検索はVectastain® Elite ABCキット(Vector社, USA)を用いたavidin-biotinylated peroxidase complex(ABC)法により以下のように行った。

脱パラフィン後、内因性ペルオキシダーゼのブロッキングのために0.3%過酸化水素加メタノールで30分処理した。0.01 M phosphate buffer saline(PBS, pH 7.4)による洗浄後、非特異的反応をブロックするために1.5% normal horse serum(NHS)を20分間反応させた。一次抗体として、1% bovine serum albumin(BSA)/PBSで100倍に希釈したマウス抗ヒトプロリン水酸化酵素(β サブユニット)モノクローナル抗体(IgG₁, 富士薬品工業, 富山)または1% BSA/PBSで100倍希釈したマウス抗ヒトプロコラーゲンI(カルボキシ末端)モノクローナル抗体(IgG₁, Chemicon社, USA)を各々30分反応させた。PBS洗浄後、二次抗体と

して1.5% NHS/PBSで200倍希釈したビオチン化ウマ抗マウスIgGを30分間、PBS洗浄後、ABCを30分間それぞれ反応させた。これらの反応はすべて室温湿室内で行った。PBS洗浄後、ジアミノベンチジンで発色させ、水洗、脱水、透徹した後、エンテランニュー®(Merck社, Germany)で封入した。ツァイス社光学顕微鏡で観察し、フィルムとしてFujichrome® ISO 100(富士写真フイルム, 東京)を用いて写真撮影を行った。なお、陰性対照には一次抗体として同濃度の正常マウスIgG₁(Dako社, Denmark)を用いた。

III 結果

プロリン水酸化酵素、プロコラーゲンともに非手術家兎眼強膜には反応がごくわずかに認められた。術後1日では強膜弁下強膜内に少数認められたが、濾過部にはみられなかった。

術後4日には濾過部周辺に紡錘形の陽性反応が多数出現していた。術後7日にはその数は増加し、濾過部は閉塞していた。術後14日でも閉塞した濾過部周辺に多数の陽性反応がみられたが、術後28日では陽性反応は著明に減少していた。なお、陰性対照では全く反応は認められなかった(図1, 2)。

IV 考 按

プロリン4位水酸化酵素は、プロトプロコラーゲンのプロリン残基の4位を水酸化する酵素で、 α と β サブユニットから成るが、このうち β サブユニットはprotein disulfide isomeraseなどの活性をもつ多機能酵素である⁹⁾。プロリンの4位の水酸化はコラーゲンの三本鎖ヘリックス構造の形成および分泌に必須であり、エチル3,4-ジヒドロベンゾエートなどでプロリンの水酸化を阻害するとコラーゲン合成は阻害される⁶⁾⁷⁾。プロリン4位水酸化酵素活性は、活動性肝疾患⁸⁾、強皮症⁹⁾¹⁰⁾など、コラーゲン合成が亢進する疾患の細胞内において上昇し、コラーゲン合成活性の指標の1つとして考えられている。

眼科領域では、角膜、結膜下組織、強膜内のプロリン水酸化酵素の局在を示した報告が若干あるのみ¹¹⁾¹²⁾で、濾過手術後の創傷治癒における同酵素の動態について検討した報告は著者らが調べた範囲ではなかった。

プロコラーゲンはプロトプロコラーゲンの三本鎖ヘリックス形成により合成される⁹⁾。コラーゲンはプロコラーゲンのアミノおよびカルボキシプロペプチドが切断されたものであり、プロコラーゲンはこのプロペプチドに特異的に反応する抗体によって免疫組織化学的にコラーゲンと区別されて検出され得る。プロコラーゲンはコラーゲンのプロ体であり、その免疫反応の増加はすなわちコラーゲン合成の増加を意味すると考えられる。コラーゲンには多くの型があるが、そのプロ体として、線維形成を行うI, II, III, V型プロコラーゲンの存在が

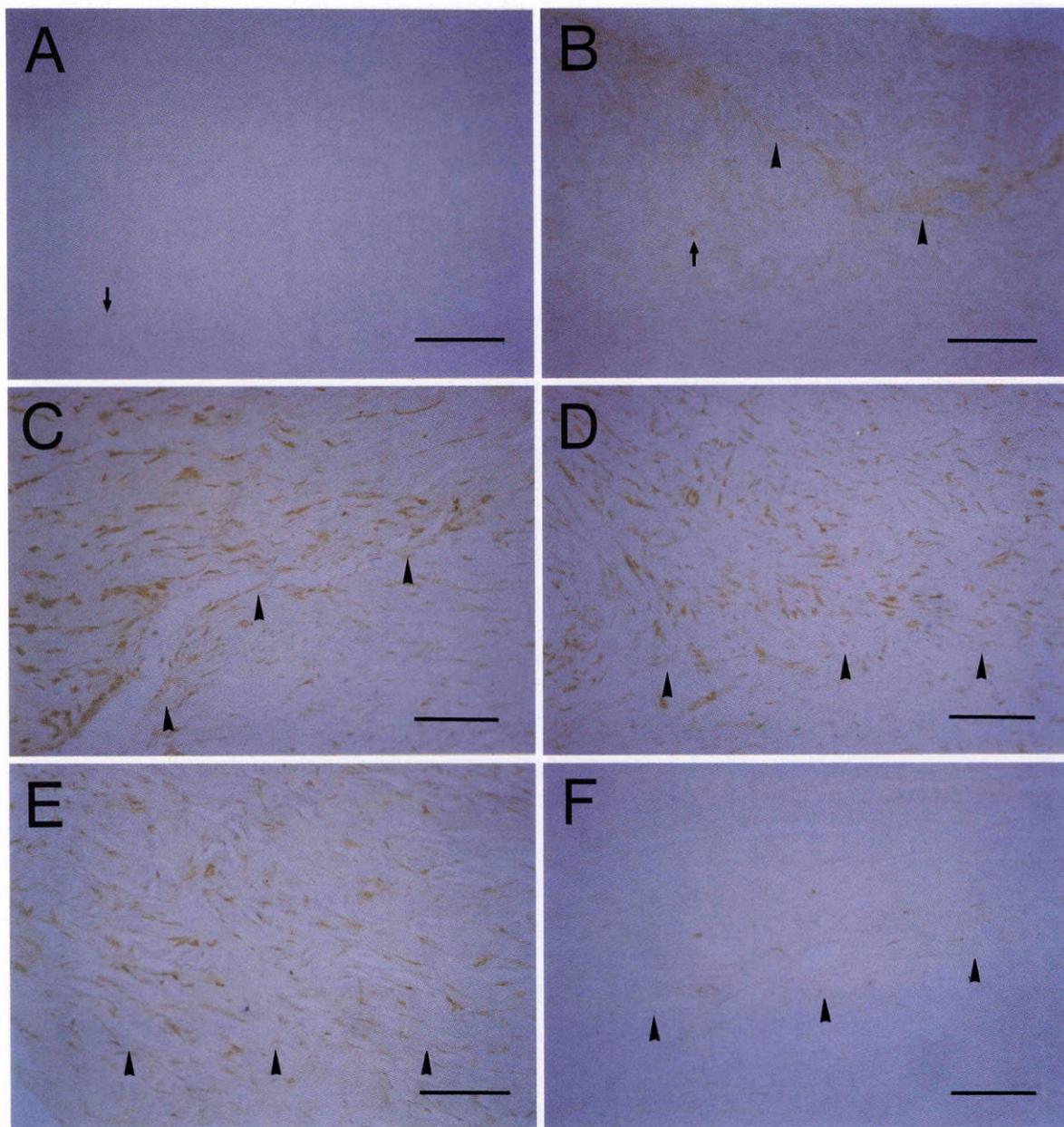


図1 非手術眼の強膜および濾過手術後の強膜濾過部におけるプロリン4位水酸化酵素 β サブユニット陽性反応。

陽性反応は褐色染色として認められる。写真左方が前房側。A：非手術眼強膜、ごくわずかに陽性反応が認められる(矢印)。B：術後1日。濾過部(矢じり)強膜弁下強膜に少数の陽性反応がみられる(矢印)。C：術後4日。開放している濾過部(矢じり)周辺の強膜に陽性反応が多数認められる。D：術後7日。濾過部および濾過部周辺強膜の陽性反応はさらに増加し、濾過部(矢じり)は閉塞している。E：術後14日。濾過部(矢じり)は完全に閉塞しているが、陽性反応は依然多数認められる。F：術後28日。陽性反応は著明に減少しており、濾過部(矢じり)に少数認められるのみである。バーは100 μ m。

明らかになっている⁶⁾。今回の実験では、濾過手術後のコラーゲン合成活性を検討する目的で、術後濾過部におけるプロリン4位水酸化酵素とI型プロコラーゲンを免疫組織化学的に検出し、その指標とした。

家兎眼強膜において、プロリン水酸化酵素、プロコラーゲンとも同様の経過を示した。すなわち、まず非手術眼強膜においても反応がごくわずかに認められた。プロリン水酸化酵素は正常角膜や強膜の細胞内に存在している

ことが報告されているが¹¹⁾¹²⁾、非手術眼強膜細胞のコラーゲン合成活性は低いものと思われる。両反応は、術後1日には強膜弁下強膜内に少数認められたが、濾過部にはみられなかった。術後4日には濾過部周辺に陽性細胞が多数出現し、術後7日にはその数は増加した。術後14日でも閉塞した濾過部周辺に多数の陽性反応がみられたが、術後28日では陽性反応は著明に減少していた。各抗原は紡錘形に染色されており、線維芽細胞内ないし

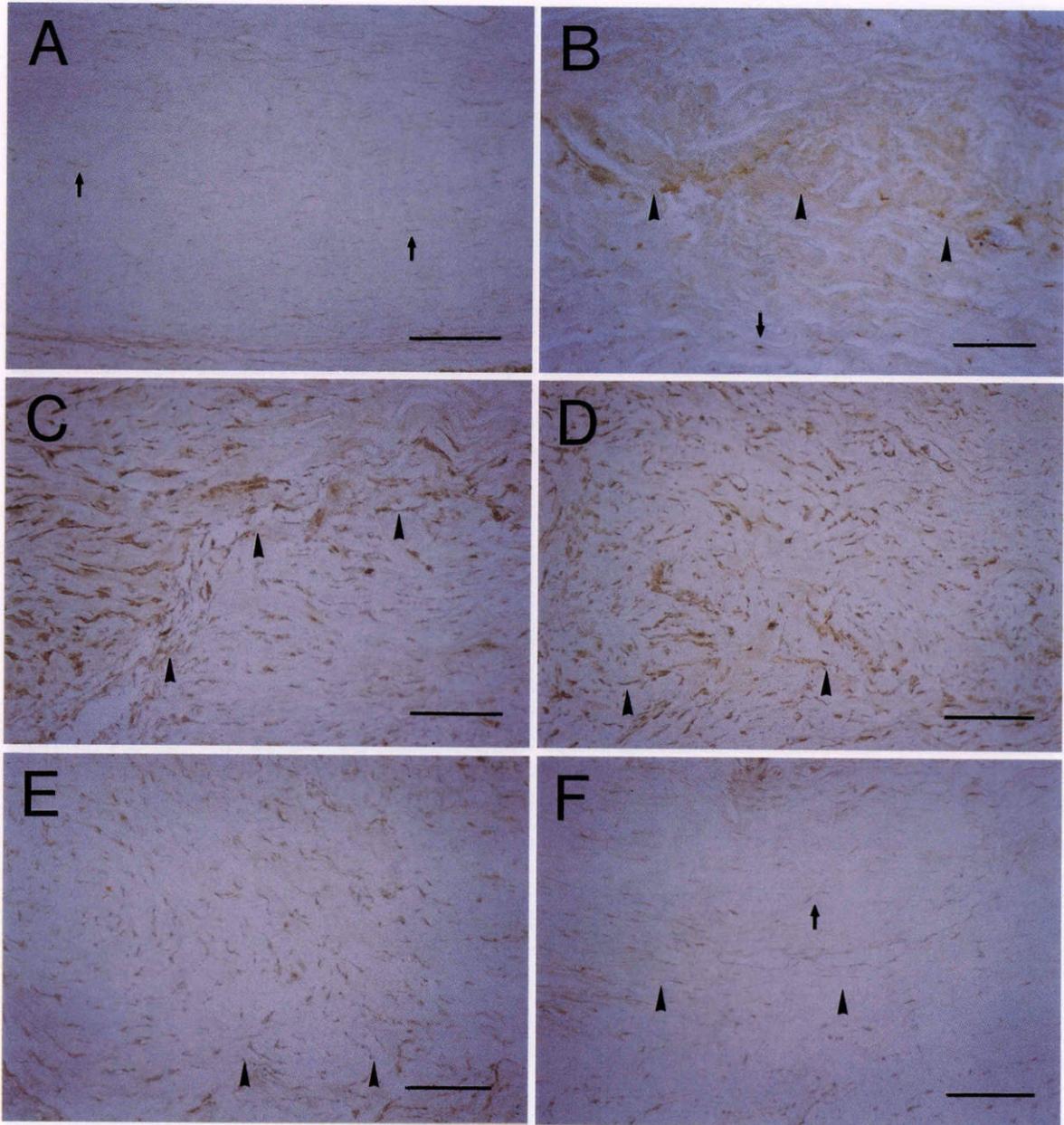


図2 非手術眼の強膜および濾過手術後の強膜濾過部におけるI型プロコラーゲン陽性反応。陽性反応は褐色染色として認められる。写真左方が前房側。A：非手術眼強膜。わずかに陽性反応が認められる(矢印)。B：術後1日。濾過部(矢じり)の強膜弁下強膜に少数の陽性反応がみられる(矢印)。C：術後4日。濾過部(矢じり)周辺の強膜に強い陽性反応が多数認められる。D：術後7日。濾過部および濾過部周辺強膜の陽性反応はさらに増加し、濾過部(矢じり)は閉塞している。E：術後14日。濾過部(矢じり)は完全に閉塞しているが、陽性反応は依然多数認められる。F：術後28日。陽性反応は著明に減少している。バーは100 μm

その周辺に存在しているものと思われる。プロリン4位水酸化酵素 β サブユニットには前述のように他の酵素活性がある⁶⁾が、その反応がプロコラーゲンと同様の経過をたどったことから、この反応がプロリン水酸化酵素としてのものであることを強く示唆している。

濾過手術後の細胞増殖活性については、オートラジオグラフィを用いたJampelら⁴⁾の報告、proliferating cell nuclear antigenを指標とした既報⁵⁾があり、それらによれば細胞増殖活性は術後5日前後で亢進し、術後

11~14日で著明に低下するとされている。一方、実験結果から、コラーゲン合成活性の亢進は術後4日にはすでに始まり、術後14日でも持続し、術後28日の時点では低下していると考えられる。すなわち、コラーゲン合成亢進は細胞増殖とほぼ同時期に開始し、細胞増殖活性が沈静化した後も続き、濾過部の瘢痕化をもたらすことが確認された。なお、房水中に含まれる高濃度のアスコルビン酸などは細胞増殖を抑制することが報告されており¹³⁾、濾過手術後の濾過部創傷治療は濾過部を通過する

房水により修飾される可能性がある。術後7日前後で濾過部は閉塞し、房水の通過が消失するが、これにより細胞増殖とコラーゲン合成が影響されることも考えられ、房水の濾過部創傷治癒に対する *in vivo* での影響について、さらに研究が必要であると思われる。

最近、エチル 3, 4-ジヒドロベンゾエート⁷⁾、フィブロスタチン-C⁹⁾、インターフェロン- γ ¹⁰⁾、ドキシソルビシン¹⁴⁾などの投与により、*in vitro* で線維芽細胞のプロリン 4 位水酸化酵素が阻害され、コラーゲン合成が抑制されることが報告されている。従来、濾過手術術後には 5-フルオロウラシルやマイトマイシン C などの細胞増殖抑制剤が併用されることが多かったが^{15)~17)}、コラーゲン合成抑制剤が *in vivo* でも有効かつ副作用が少なければ、術後成績がより良好となることが期待できる。今回の実験を進展させることにより、これらコラーゲン合成抑制剤の、緑内障濾過手術後における癒痕化に対する *in vivo* での効果を今後検討する予定である。

本論文の一部は第 98 回日本眼科学会総会で講演した。なお、本研究は公益信託三島済一記念眼科研究国際交流基金の補助を受けた。

文 献

- 1) Skuta GL, Parrish RK II: Wound healing in glaucoma filtering surgery. *Surv Ophthalmol* 32: 149-170, 1987.
- 2) 渡辺穰爾: 家兎濾過手術における濾過部のフィブリンおよびフィブロネクチンの動態. *眼紀* 43: 1441-1447, 1992.
- 3) 渡辺穰爾: 家兎トラベクトミー後の濾過部創傷治癒に対するマイトマイシンの影響. 第 2 報. フィブロネクチンの動態. *眼紀* 44: 964-969, 1993.
- 4) Jampel HD, McGuigan LJB, Dunkelberger GT, L'Hernault NL, Quigley HA: Cellular proliferation after experimental glaucoma filtration surgery. *Arch Ophthalmol* 106: 89-94, 1988.
- 5) 渡辺穰爾, 沢口昭一, 阿部春樹, 岩田和雄: 家兎濾過手術後における proliferating cell nuclear antigen の発現. *日眼会誌* 97: 1274-1278, 1993.
- 6) 藤本大三郎(編): 細胞外マトリックスのバイオサイエンスとバイオテクノロジー. 2 版. アイピーシー, 東京, 165-174, 1991.
- 7) Sasaki T, Majamaa K, Uitto J: Reduction of collagen production in keloid fibroblast cultures by ethyl-3,4-dihydroxybenzoate. Inhibition of prolyl hydroxylase activity as a mechanism of action. *J Biol Chem* 262: 9397-9403, 1987.
- 8) Takahara T, Nakayama Y, Itoh H, Miyabayashi C, Watanabe A, Sasaki H, et al: Extracellular matrix formation in piecemeal necrosis: Immunoelectron microscopic study. *Liver* 12: 368-380, 1992.
- 9) Kawaguchi Y, Harigai M, Kitani A, Suzuki K, Kawakami M, Ishizuka T, et al: Effect of prolyl 4-hydroxylase inhibitor on fibroblast collagen production *in vitro*: An approach to the treatment of systemic sclerosis. *J Rheumatol* 19: 1710-1715, 1992.
- 10) Kawaguchi Y, Kitani A, Hara M, Harigai M, Hirose T, Suzuki K, et al: Cytokine regulation of prolyl 4-hydroxylase production in skin fibroblast cultures from patients with systemic sclerosis: Contribution to collagen synthesis and fibrosis. *J Rheumatol* 19: 1195-1201, 1992.
- 11) Ahmad M, Church RL: Amino acid sequence analysis of proteins in the human corneal stromal cell membrane. *Curr Eye Res* 10: 35-46, 1991.
- 12) Yamanaka O, Saika S, Kobata S, Uenoyama K, Ooshima A: Immunolocalization of alpha-and beta-subunits of prolyl-4-hydroxylase in rat limbal tissue and cultured subconjunctival fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 1429, 1994.
- 13) Jampel HD: Ascorbic acid is cytotoxic to dividing human tenon's capsule fibroblasts. A possible contributing factor in glaucoma filtration surgery success. *Arch Ophthalmol* 108: 1323-1325, 1990.
- 14) Sasaki T, Holeyfield KC, Uitto J: Doxorubicin-induced inhibition of prolyl hydroxylation during collagen biosynthesis in human skin fibroblast cultures. Relevance to impaired wound healing. *J Clin Invest* 80: 1735-1741, 1987.
- 15) Nakano Y, Araie M, Shirato S: Effect of postoperative subconjunctival 5-fluorouracil injections on the surgical outcome of trabeculectomy in the Japanese. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 227: 569-574, 1989.
- 16) Watanabe J, Iwata K, Sawaguchi S, Nanba K: Trabeculectomy with 5-fluorouracil. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 72: 455-461, 1991.
- 17) Kitazawa Y, Kawase K, Matsushita H, Minobe M: Trabeculectomy with mitomycin. A comparative study with fluorouracil. *Arch Ophthalmol* 109: 1693-1698, 1991.