

氏名	なか がわ やす あき 中 川 泰 彰
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 1525 号
学位授与の日付	平成 6 年 1 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	医学研究科外科系専攻
学位論文題目	Calcium-Dependent Neutral Proteinase (Calpain) in Fracture Healing of Rats (ラットの骨折治癒過程におけるカルシウム依存性中性蛋白分解酵素(カルパイン)の働き)
論文調査委員	(主 査) 教授 畑中正一 教授 岡 正典 教授 山室隆夫

論 文 内 容 の 要 旨

〔目的〕 カルシウム依存性中性プロテアーゼであるカルパインには、低カルシウム濃度で働くⅠ型と、高濃度で働くⅡ型の二種類がある。これまでの研究で、骨端軟骨板の肥大軟骨細胞層にカルパインⅡが存在すること、カルパインがプロテオグリカン分解活性を持つこと、変形性関節症の関節液中にカルパインが活性を持って存在する事が明らかにされており、カルパインは内軟骨性骨化に促進的に働いていると推察される。そこで、今回、同じ内軟骨性骨化を呈する骨折仮骨について、カルパインの動態を調べてみた。

〔方法及び結果〕 生後 6 から 8 週齢のウイスター系ラットを手術的に骨折させ、外固定なしに飼育した。骨折後 5 ～ 28 日で屠殺し、以下の分析を行った。生化学的には、仮狭のみを採取し、DE-52 クロマトグラフィーにかけてカルパインを分離し、カゼインの分解反応でカルパイン活性を測定した。又、この活性のあるフラクションをカルパインⅡの抗血清を用いた Western blotting により、カルパインⅡであることを同定した。カルパインⅡの活性は、5 日目で最大値を呈し、7、10 日目でも高値を示す、その後、急速に減少した。組織学的には、カルパインⅠ及びⅡの抗血清を使用して、免疫組織染色 (PAP 法) にて、それらの局在と経時変化を観察した。骨折後 5 日目の仮骨では炎症細胞及び線維組織にカルパインⅡの局在が認められた。又、7、10 日目の仮骨では軟骨細胞内及び細胞外基質に豊富に認められ、その後、減衰していった。カルパインⅠは染色されなかった。そこで、プロテオグリカンを含む仮骨の切片上に、ラット腎由来のカルパインⅡを作用させた後、サフラニン-0 染色をしてみると、その染色性は著明に低下し、カルパインⅡのインヒビターを使ったり、カルシウムのない状態にしてカルパインの作用しない状況を作ると、サフラニン-0 の染色性は低下しなかった。つまり、in vitro においてカルパインⅡは骨折仮骨のプロテオグリカンを分解することが判った。

〔考察〕 以上のことから、骨折仮骨において、カルパインⅡは生化学的にも免疫組織学的にも、炎症期及び軟仮骨期に増加し、硬仮骨期及び骨改変期に減少することが判った。骨折仮骨においてカルパインⅡの正確な働きは不明であるが、骨折治癒過程に応じて変動する点、プロテオグリカン分解活性を持ってい

る点から、何等かの基質プロテアーゼとして働いている可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

カルパインは内軟骨性骨化に対して促進的に働いていると推察されている。そこで、同じ内軟骨性骨化を呈する骨折仮骨に於けるカルパインの動態をしらべる目的で次の研究を行なった。生後6～8週のウイスター系ラットの脛骨を骨折させ5～28日間のカルパインの仮骨肉における経時的变化を生化学的および免疫組織学的に観察した。カルパイン活性は骨折後5日目で最大値を示し、10日以後急速に減退した。同様に骨折後5日目の骨折部の炎症細胞内および線維組織にカルパインⅡが多く認められ、骨折後7～10日目では軟骨細胞内および細胞外基質にカルパインⅡが豊富に認められ、その後減少した。プロテオグリカン分解活性を有するカルパインが、この様に骨折治癒過程に応じて変動することはカルパインⅡが基質プロテアーゼとして作用している可能性があることを示唆している。

以上の研究は内軟骨性骨化におけるカルパインの役割を解明するのに寄与するところが多い。したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は平成5年12月24日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。