顎関節円板構成コラーゲンの生化学的分析

鹿島 健司

Biochemical studies on collagen in temporomandibular joint discs

Kenji KASHIMA

Abstract: Biochemical reports on temporomandibular joint (TMJ) composition at physiological and pathological conditions have been rather scarce when compared to those of morphological studies. The present investigation was intended to characterize cross-links and types of collagen in TMJ disc, which is thought to be one of the most important elements in maintaining the structure, strength and smooth function of the joint.

Amino acid analyses of human and porcine TMJ discs ascertained that collagen was the majority among the tissue components. Reducible cross-links were analyzed by radiochromatography after reducing with $[^3\text{H}]\text{-NaBH}_4$ and characteristic patterns were obtained in reducible cross-links of porcine and human samples, respectively. In porcine discs, relatively large amounts of reducible cross-links such as dihydroxylysinoxidation product, hydroxylysinoxidation product and histidinohydroxymerodesmosine were detected. Age-related decrease in all of the reducible cross-links was observed. Human discs contained less amount of reducible cross-links than porcine samples. However, one reducible component related to hexitollysine, which is designated A1, was abundant in human discs.

Non-reducible cross-links, pyridinoline and histidinolalanine in TMJ discs, were determined with an amino acid analyzer after hydrolysis. The former was detected in all tissue samples examined and was found to decrease with aging. The latter, which is considered to be a cross-link between collagen and related proteins, was detected in aged samples especially in perforated disc but not found in younger samples.

Collagen type analysis by gel electrophoresis revealed that both porcine and human TMJ discs consisted almost exclusively of type I, however, porcine sample contained a trace amount of type III collagen.

Key words: TMJ disc, collagen, cross-link

緒 言

顎関節疾患には、外傷をはじめ炎症、腫瘍などがあり、なかでも顎関節症は最近の社会環境の複雑化に伴い増加の傾向にある¹⁾。本症は、その多様な臨床症状から

種々の病名が用いられてきたが、柴田ら²⁾は最近、顎関節症を大きく三つの症型に分類している。すなわち、(1)咀嚼筋に障害が限局するもの、(2)顎関節部軟組織に障害が及ぶもの、(3)顎関節部硬組織に障害が及ぶものの、3症型である。このうち、顎関節部軟組織の障害は、早期に関節円板に病的変化が現れることが多いと述べている。

Scapino³⁾は、正常顎関節および関節円板に異常が認められた症例の顎関節組織所見について観察し、コラーゲン線維の配列、走行について詳細に検索している。また、最近 Isacson ら⁴⁾は強い疼痛を伴う顎関節症患者の円板切除を行い、その手術標本の組織学的検討を加え

東京医科歯科大学歯学部第1口腔外科学教室
(主任・指導：塩田重利教授)

The First Department of Oral Surgery, Faculty of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University (Chief and Director: Shigetoshi Shioda)

受付日：昭和62年11月13日

て、円板後方付着部の connective tissue hyalinization を報告している。

このように、関節円板の組織と病態に関する研究は、現在まで主として形態学的方法によるものが多く、この組織を生化学的に取り扱った研究はあまり行われていない。

これに対し、整形外科領域における関節構成成分の生化学的研究は古くから行われ、関節軟骨のグリコサミノグリカンに関して、特に早くからその一次構造や代謝過程が研究されてきた³⁾。次いで、骨、軟骨、椎間板などの主要有機成分であるコラーゲンに関して、生化学研究の進歩と共に、アミノ酸配列、二次および三次構造、合成機構、架橋構造などが漸次解明されてきた⁽⁴⁻⁹⁾。顎関節に関して、特に関節円板に関する生化学的研究は著者の渉猟した範囲では、Granström ら¹⁰⁾が、ラット、ウサギ、イヌ、サルの関節円板中のグリコサミノグリカン調べ、その結果ヒアルロン酸とデルマタン硫酸が存在し、その割合は後者の方が多いと報告している。また、Hirshmann ら¹¹⁾は、ウシ胎児の関節円板を検索したところ、その構成コラーゲンがⅠ型および滑膜由来と考えられるごく少量のⅢ型から成ると報告しているにすぎない。したがって、関節円板を構成するコラーゲンについての分子レベルでの性格やそれらと病態との関連は、現在まで明らかにされていないのが現状である。

1969年に軟骨でのⅡ型が確認されて以来¹²⁾、コラーゲンは次々に遺伝的に異なった分子種が存在が明らかにされてきており、現在主なものだけでⅠ型からⅤ型までの5種類が、さらに最近ではⅩ型まで記載がなされている¹³⁻¹⁵⁾。また、コラーゲンは分子内、分子間に架橋結合を形成することによって十分な機械的、化学的安定性を獲得するといわれ、現在約10種の架橋結合が知られており、これらは還元性、非還元性架橋に大別される。コラーゲンのこのような型や架橋結合は、各組織においてほぼ一定の特徴を持っており、さらに加齢によっても特徴的な変化が進行するといわれている¹⁶⁾。これらのことから本研究では関節円板の構成成分の主体であるコラーゲンに着目し、その生化学的性状を明らかにするため、ヒトおよびブタの関節円板を用いて型および架橋結合分析を行った。また、病的状態のヒト関節円板についても分析したのであわせて報告する。

実験材料

ヒト顎関節円板は剖検および手術摘出物から得たものを試料とした。年齢は26歳～85歳(平均58.9歳)の男性9例、女性4例であり、生前、術前に顎関節疾患の訴えがないことを確認した。また、ヒトに類似した咬合様式を有するブタの生後約6か月および約4年の顎関節を屠殺場より入手し、関節円板を採取した。

図1a ヒト関節円板中央部(50歳、男性)

図1b ブタ関節円板中央部(生後6か月)

採取したこれらの関節円板は顎関節円板に関する三沢の分類¹⁷⁾に準じ、関節円板のほぼ中央部で機能的関節面に相当する部位、すなわち円板関節面を周囲部分から切り分け試料とした(図1a, b)。これはその周囲の領域に存在する血管由来コラーゲンの混入を排除するためである。

ヒト関節円板では、2例に穿孔が観察された(図2a, b)。75歳の症例は円板関節面外側に小穿孔があり、穿孔部周囲をさらにその周囲組織と分けて採取し、また、50歳の症例では円板全体に及ぶ大穿孔がみられ、わずかに残存していた円板組織を採取し、それぞれ試料とした。

生後約6か月および約4年のブタ皮膚を採取し、対照として用いた。

得られた試料は0.9% NaCl/0.05 M Tris-HCl (pH 7.4) にて洗浄後、分析まで -20°C にて保存した。

実験方法

1. 水分含量の測定

0.9% NaCl/0.05 M Tris-HCl (pH 7.4) で洗浄した試料より、濾紙にて余剰の水分を除去し、この凍結乾燥

図 2a 関節円板穿孔例 (75歳, 女性)

関節円板を前方に翻転させ、下顎頭と円板下面を上方よりみた

図 2b 関節円板大穿孔例 (50歳, 男性)

本症例では、穿孔部周囲の残存円板組織を採取して試料とした

前後の重量から水分含量を測定した。

2. コラーゲンの抽出法

以下の操作は特に記載がない限り 4°C で行った。

Kuboki ら¹⁸⁾の方法に従い、試料を細分割し、さらに液体窒素中で粉砕して3種のプロテアーゼ阻害剤 (100 mM 6-アミノ-n-カプロン酸, 5 mM 塩酸ベンザミジン, 1 mM ベンジルスルホニルフルオリド) を含む 1 M NaCl/0.05 Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) にて 48 時間, 3 回抽出を行った。この後遠心 (30,000 × g, 30 分) にて分離し、可溶性と不溶性画分とに分けた。おのおのの冷蒸留水に対して透析脱塩後、凍結乾燥して中性塩可溶性画分および中性塩不溶性画分とした。

おのおのの画分の一部は後述するアミノ酸分析を行い、コラーゲン含量を算出した。

3. アミノ酸分析

中性塩可溶性画分および中性塩不溶性画分を 6 N 共沸塩酸に懸濁、窒素置換後減圧封管し、110°C, 24 時間加水分解を行った。加水分解後、ロータリーエバポレー

ターにて塩酸を除去し、0.5 mg/ml となるように蒸留水に溶解して日立 835-50 型高速アミノ酸分析計にてリチウム系標準 5 緩衝液システムを用いて分析した。

4. 還元および加水分解処理

久保木らの方法¹⁹⁾に従って、中性塩不溶性画分を 0.15 M Tris 緩衝液 (pH 7.4) 中に懸濁させ一晩放置した後、還元を行った。すなわち、0.5% [³H]-NaBH₄ (Amersham, 167 mCi/mmol) N, N-Dimethyl-formamide (和光純薬) 溶液を、試料乾燥重量の 1/30 になるように 3 回に分けて加え、室温にて計 1 時間反応させた。2 N 酢酸にて pH 4 まで下げて反応を停止させ、冷蒸留水にて透析し過剰の試薬を除去した後凍結乾燥した。

この試料に 6 N 共沸塩酸を加え、窒素置換減圧下で封管し、110°C, 24 時間加水分解を行った後、ロータリーエバポレーターにて塩酸を除去し、20 mg/ml となるように試料を蒸留水に溶解した。

5. 還元性架橋結合分析

この還元試料を 5 mg/ml となるように蒸留水で希釈し還元性架橋結合分析用試料とし、久保木ら¹⁹⁾の自動分析システムにより還元性架橋結合分析を行った。すなわち、日立製汎用液体クロマトグラフ 034 型装置 (日立樹脂 #2611, 0.9 × 44 cm ジャケット付カラム, 60°C) を用いて、0.2 M Na-クエン酸緩衝液 (pH 3.5) にて 1 時間, 0.35 M Na-クエン酸緩衝液 (pH 5.28) にて 3 時間, 流速 60 ml/hr で展開して架橋結合の分離を行った。溶出液は分岐ポンプを用いて 2 分し, 1/3 をニンヒドリン発色系に, 2/3 を放射能測定装置に送った。放射能測定は溶出液に 2 倍量の PCS 液体シンチレーションカクテル (Amersham) を混合し、連続放射能測定装置 (アロカ製ラジオグラフ) を用いて行った。

6. 非還元性架橋結合 (ビリジノリン) およびコラーゲン関連タンパク質架橋結合 (ヒスチジノアラニン) の分析

20 mg/ml の濃度の還元水解物を日立 L-8500 型高速アミノ酸分析計により、リチウム緩衝液系で行った。ビリジノリン、ヒスチジノアラニンの同定は、東京農工大学藤本大三郎教授より恵与された標準サンプルを用いて行った。アミノ酸分析系上の溶出位置が他のピークと重ならないことをいくつかの異なった緩衝液系で確認し²⁰⁾、今回はビリジノリンの分析には pH 3.6, 60°C, ヒスチジノアラニンでは pH 4.1, 60°C の系を用いた。

7. ペプシン可溶性コラーゲンによる型分析

1) ペプシン可溶性コラーゲンの調製

ヒトおよびブタ関節円板の中性塩不溶性画分を 0.5 M 酢酸中で試料の 1/10 量のペプシン (Sigma, 2,900 units/mg) を用い、4°C にて 24 時間消化を行い 100,000 × g, 60 分遠心し、残渣については同様の操作を繰り返した。5 回の消化によって得られた上清に終濃度 1.5 M と

ように NaCl を加え、生じた沈殿を 70,000×g、30 分
離心して集め、冷蒸留水に対し透析脱塩を行った後、凍
結乾燥しペプシン可溶性コラーゲンとした。

2) 途中還元ゲル電気泳動

Sykes ら²¹⁾の方法に従って行った。すなわち、6%ポ
リアクリルアミドゲル (0.5×10 cm、ディスク) と、緩
衝液は 0.1% SDS/0.1 M Tris-Borate (pH 8.6) を用
い、試料は 2% SDS/30% グリセロール/2 M 尿素/0.02
M Tris-Borate (pH 8.6) 中で 60℃、30 分間加熱変性
させ、泳動開始後約 1.2 mm 移動したところで中止し、
緩衝液を一度除去して 10% 2-メルカプトエタノールを
ゲル上部に 1 時間作用させて還元を行った。

還元終了後、ゲル上部を泳動用緩衝液で十分洗浄して
再び電気泳動を継続し、全部で約 9 cm 泳動した。泳動
終了後、ゲルを 0.25% クマシーブリリアントブルー R-
50 染色を行い、7.5% 酢酸、5% メタノール水溶液で
脱色した。

8. ブロムシアン (CNBr) 分解法による型分析

1) ブロムシアン分解法

ヒト関節円板のペプシンによる可溶化がほとんど困難
であったためブロムシアン分解を行い、ヒトおよびブ
タ関節円板の 1 M NaCl 不溶性画分についてブロムシア
ンペプチドからの型分析を試みた²²⁾。試料の約 100 倍量
の 70% 酢酸に窒素ガスを十分吹き込んだ後、試料の約 2
倍重量のブロムシアンを加えて密栓し、25℃ で 6 時間
反応させた。その後、遠心 (5,000×g、20 分) し、上清
を冷蒸留水にて 10 倍希釈し、ただちに凍結乾燥した。

また、ブタ皮膚より抽出した I 型および I 型+III 型コ
ラーゲンを同様の方法でブロムシアン分解し、I 型およ
び III 型コラーゲン由来ブロムシアンペプチドの確認に用
いた。

2) SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動

Laemmli²³⁾の方法に準じて SDS ポリアクリルアミド
電気泳動を行った。2.5% の濃縮ゲル、12.5% の分離の
リアクリルアミドスラブゲルを用い、緩衝液は 0.1%
SDS/0.025 M Tris-HCl/0.192 M グリシン (pH 8.3)
を用いた。試料は 2% SDS/25% グリセロール/5% 2-
メルカプトエタノール/2 M 尿素/0.0625 M Tris-HCl
(pH 6.8) 中で 60℃、30 分間加熱変性させた。泳動終
了後、ゲルを 0.25% クマシーブリリアントブルー R-250
染色を行い、30% メタノール/10% 酢酸にて脱色した。

結 果

1. 水分含量

ブタ関節円板の水分含量は、生後 6 か月では 60.7～
61.4%、平均 61.4% であり、4 年では 60.1～66.6%、平
均 61.3% であった。また、ヒトでは 40 歳～85 歳にわたる
10 検体についてその検索を行ったが、69.3～75.4%、

図 3 関節円板の水分含量

表 1 関節円板 (中性塩不溶性画分) のアミノ酸組成

	ブ タ		ヒ ト			
	(6 か月)	(4 年)	(26歳)	(40歳)	(50歳)	(75歳)
Hyp	88	99	98	98	94	93
Asp	49	41	38	37	43	41
Thr	25	19	19	18	19	18
Ser	41	36	33	35	37	34
Glu	78	73	70	71	75	76
Pro	117	130	126	126	119	121
Gly	288	315	320	322	325	332
Ala	99	106	100	102	104	109
Val	30	26	28	25	25	26
Met	7	5	7	7	8	9
Cys	3	1	1	1	1.5	0.5
Ile	15	11	13	12	14	13
Leu	37	28	29	29	29	28
Tyr	10	6	6	6	5	4
Phe	19	16	15	14	14	14
Hyl	8	9	8	9	8	8
Lys	28	23	33	34	24	22
His	9	6	7	7	7	5
Arg	49	50	49	48	48	47

[残基数/1,000残基]

平均 71.7% であった。これらは特に年齢的な変化は認め
られなかった (図 3)。

2. アミノ酸分析およびコラーゲン含量

各試料の中性塩不溶性画分のアミノ酸分析の結果の一
部を表 1 に示した。グリシンが全アミノ酸残基数の約
1/3 を占め、また、ヒドロキシプロリンも全残基数の約
1/10 を占め、各試料が大部分コラーゲンより構成されて
いることが確認された。

表2 コラーゲンの可溶性

		中性塩可溶性 コラーゲン	ペプシン可溶性 コラーゲン	CNBr による 分解率
ブタ顎関節円板	(6 か月)	4.26%	64.6%	98.0%
	(4 年)	3.61	46.6	—
皮 膚	(6 か月)	5.28	96.2	92.5
	(4 年)	3.14	89.9	—
ヒト顎関節円板	(26 歳)	trace	trace	58.0
	(40 歳)	trace	trace	50.0
	(66 歳)	trace	trace	30.8
	(75 歳)	trace	trace	30.3

—: 測定せず

図4 関節円板の全タンパク質に占めるコラーゲンの比率

これらのヒドロキシプロリン含有量からコラーゲン含量を算出し、関節円板の全タンパクに占めるコラーゲンの比率を調べた(図4)。ブタでは生後6か月と4年とでそれぞれ組織乾燥重量当たり平均81.9%, 90.3%であり、加齢によりコラーゲン量の増加が認められた。ヒトでは26~85歳, 12検体を調べたが82.9~90.0%であり、加齢変化による有意の増減傾向を示さなかった。これらは平均すると87.1%であった。

3. コラーゲンの可溶性

生後6か月のブタ関節円板の中性塩可溶性コラーゲンは全コラーゲンの4.26%, 4年のそれは3.61%であった。ペプシン処理によって可溶性は増加し、前者は64.6%, 後者は46.6%となった。対照として各年齢のブタ皮膚コラーゲンの可溶性を同時に測定したが、中性塩可溶性コラーゲンは6か月では5.28%, 4年で3.14%, ペプシン可溶性コラーゲンはおのおの96.2%, 89.9%を示し、加齢による抽出性の低下が各組織において認められた。また、ヒト関節円板は中性塩およびペプシン溶液に対しほとんど抽出されなかった(表2)。ブロムシアンの分解率をみると、6か月のブタでは関節円板・皮膚ともに90%以上が分解され、ヒトでは30.3~58.0%と

加齢による変化が顕著にみられた(表2)。

4. 還元性架橋結合分析

1) ブタ関節円板と皮膚との比較

ブタ関節円板および皮膚構成コラーゲンの還元性架橋のラジオクロマトグラムパターンにおいては初めて $[^3\text{H}]\text{-H}_2\text{O}$ が、続いて Dihydroxynorleucine: DHLNL, Hydroxynorleucine: HNL, Chloronorleucine: CNL といった架橋前駆体および2つの還元性物質, Hexitollysine: A1, Hexitollysine anhydride: A2 が溶出し、その後還元性架橋として重要な Dihydroxylysinonorleucine (DHLNL), Hydroxylysinonorleucine (HLNL), Histi-dinohydroxymerodesmosine (HHMD) が溶出した(図5)。

関節円板、皮膚はそれぞれ組織および年齢差による異なったクロマトパターンを示した。また、分析に当たり各試料についてラベルした放射能が同量となるようにチャージしたが、関節円板、皮膚ともに加齢によって DHLNL と HLNL のピークが顕著に減少した。主要な3種の架橋結合の相対量を明確にするためピーク面積の割合を表3に示したが、これよりこれら2つの組織において、加齢により DHLNL および HLNL は減少するが HHMD の相対量の増加が認められた。

コラーゲン代謝の一つの指標とされている DHLNL/HLNL の比は関節円板では6か月で1.00, 4年で0.97, 皮膚においてはそれぞれ0.23, 0.17であり、各組織において加齢により減少したが、その割合は皮膚のほうがわずかに大であるように思われた。次に、還元性架橋分析に用いた試料をアミノ酸分析して、そのヒドロキシプロリン量を求めヒドロキシプロリン当たりの各還元性架橋結合量を算出し、コラーゲン当たりの量の指標とした(図6)。皮膚に比べ、関節円板ではコラーゲン当たり HLNL, HHMD 量が少ないことが示唆され、また、どちらの組織においても加齢による架橋量の減少が認められた。すなわち3種の還元性架橋の相対的な割合では加

表 3 ブタ顎関節円板および皮膚コラーゲンの還元性架橋結合の比率

		DHLNL	HLNL	HHMD	DHLNL/HLNL
ブタ顎関節円板	(6 か月)	29.7%	29.8%	40.5%	1.00
	(4 年)	25.1	25.9	49.0	0.97
ブタ皮膚	(6 か月)	8.5	37.4	54.2	0.23
	(4 年)	5.7	32.9	61.3	0.17

図 5 ブタ顎関節円板および皮膚のコラーゲン還元性架橋結合溶出パターン
A) 関節円板 (6 か月) B) 関節円板 (4 年)
C) 皮膚 (6 か月) D) 皮膚 (4 年)

図 6 ブタ顎関節円板、皮膚におけるコラーゲン当たりの各還元性架橋結合量、縦軸を CPM/nmol Hyp とした
○ DHLNL ● HLNL □ HHMD

齢によって DHLNL、HLNL の減少、HHMD の増加がみられたが、コラーゲン当たりの架橋量についてみるといずれも減少していることが観察された。さらに皮膚においては生後 4 年時においても HLNL、HHMD が多く存在していた。

2) ヒト顎関節円板について

ヒト顎関節円板コラーゲンの還元性架橋のクロマトグラムパターンでは、ブタの場合と比較して還元性架橋である DHLNL、HLNL、HHMD のピークが低く、還元性物質である A1 のピークが顕著に高いことが観察された(図 7)。D) は C) の顎関節円板にみられた穿孔部周囲を採取して分析に供したもので、前駆体のピーク以外では、さらにその周囲組織である C) との架橋パターンで大きな差異は認められなかった。これら 4 例を合わせ還

図7 ヒト関節円板のコラーゲン還元性架橋結合溶出パターン

A) 26歳 B) 50歳 C) 75歳 D) 75歳, 穿孔部周囲

元性架橋分析を行った計10例について、ブタの場合と同様にピーク面積の割合を表4に示した。DHLNLの割合は18.2~33.1%, HLNLは37.9~54.3%, HHMDは20.6~44.2%であった。DHLNL/HLNLの比は0.35~0.82であり、加齢によって若干の減少傾向を示した。また、大穿孔がみられた50歳の円板では0.82と、他に比較して大きな値を示した。

5. 非還元性架橋結合分析

ブタおよびヒト(26~75歳, 6検体)関節円板の非還元性架橋結合ピリジノリン²⁴⁾ならびにコラーゲン関連タンパク質の架橋結合であるヒスチジノアラニン²⁵⁾について、アミノ酸分析計より得たそれらの測定値を、同様にして得たヒドロキシプロリン300nmolあたりに算出し、コラーゲン当たりの指標として表した(表5)。ブタではピリジノリンは生後6か月時で0.67nmol, 4年時で0.47nmolと加齢により減少を示したが、ヒスチジノアラニンは検出限界以下であった。ヒトではピリジノリンは26歳で0.68nmol, 40歳で0.62nmolであるが69歳で0.28nmol, 75歳では0.14nmolと加齢によって減少を示した。また、75歳の症例でみられた関節円板

表4 ヒト関節円板構成コラーゲンの還元性架橋結合の比率

症例	年齢	性	DHLNL	HLNL	HHMD	DHLNL/HLNL
1	26	♀	20.4%	43.5%	36.1%	0.47
2	40	♂	20.5	42.5	37.0	0.48
3	50	♂	31.4	48.0	20.6	0.65
4*	50	♂	33.1	40.5	26.4	0.82
5	60	♂	18.2	42.9	39.8	0.42
6	69	♀	21.0	54.3	24.7	0.39
7	69	♂	18.3	51.9	29.8	0.35
8	73	♀	18.9	37.9	44.2	0.48
9	75	♀	18.8	53.3	27.9	0.35
10*	75	♀	18.2	52.7	29.2	0.35

* は穿孔部周囲の円板組織を表す

症例4は大穿孔を伴うもの

症例10は小穿孔周囲の円板組織で、症例9はさらにその周囲部の円板組織である

表5 ピリジノリン(Pyr)およびヒスチジノアラニン(HAL)の分析

	ブタ		ヒト					P
	(6か月)	(4年)	(26歳)	(40歳)	(69歳)	(73歳)	(75歳)	
Pyr	0.67	0.47	0.68	0.62	0.28	0.20	0.14	0.22
HAL	*	*	*	*	0.25	0.24	0.29	0.59

* : 0.05>で検出限界以下

P : 穿孔部周囲

[nmol/Hyp 300 nmol]

図8 ペプシン可溶性コラーゲンの途中還元ゲル電気泳動像(6%ポリアクリルアミドゲル)
1: I型コラーゲン, 2: III型コラーゲン,
3: ブタ皮膚(生後6か月) 4: ブタ関節円板(生後6か月), 5: ブタ関節円板(生後4年)

の穿孔部周囲の試料では0.22 nmolと、さらにその周囲の正常と考えられる組織に比し、やや高い値であった。ヒスチジノアラニン40歳までは検出限界以下であり、69歳では0.25 nmol, 73歳で0.24 nmol, 75歳で0.29 nmolであった。穿孔部周囲の試料では0.59 nmolと約2倍の高い値を示した。

6. コラーゲン型分析

1) 途中還元ゲル電気泳動

ペプシン可溶性コラーゲンのSDSディスク電気泳動パターンを図8に示した。I型スタンダードと同様、関節円板では $\alpha 1(I)$ 、 $\alpha 2(I)$ のバンドが認められ、これらのデンストメーターによる比率は2:1を示した。これより生後6か月および4年のブタ関節円板がI型コラーゲンから構成されていることが示唆された。

2) ブロムシアンペプチドのSDSスラブ電気泳動

ヒト関節円板がペプシン溶液によりほとんど抽出されないこと、およびブタ関節円板においても生後6か月でその抽出率が64.6%ということより、ブロムシアン分解を行い、そのブロムシアンペプチドの電気泳動パターンから型分析を試みた。

ブタ関節円板には痕跡程度にIII型コラーゲン由来の $\alpha 1(III)$ -CB-5, 9が認められた。ヒトの泳動像はI型コラーゲンのパターンを示し、 $\alpha 1(III)$ -CB-5, 9のバンドはみられなかった(図9)。

考 察

顎関節は側頭骨下顎窩および関節結節と下顎骨関節突起とによって構成される二軸性の蝶番滑走関節である。両者の間には関節円板が介在し上下関節腔に二分され、これによって下顎頭の前滑走運動が可能となる²⁵⁾。ヒ

図9 CNBr 分解法による12.5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動像
1: I型コラーゲン, 2: ヒト関節円板(40歳, 男性) 3: ヒト関節円板(26歳, 女性),
4: ブタ関節円板(生後4年) 5: ブタ関節円板(生後6か月), 6: I + III型コラーゲン

トの関節円板は、古くから組織学的な研究材料として扱われてきており、そのコラーゲン線維走行^{3,26,27)}などについて種々言及されてきた。また、ヒト胎児を用いた関節円板の prenatal growth についての研究もいくつかみられる^{28,29)}。このように関節円板の組織学的な研究は多くなされているものの、関節円板を構成する主体であるコラーゲン線維の化学的性状、また、病的変化に関する詳細な報告はなされていないのが現状である。このため本研究では、コラーゲンに機械的強度と化学的安定性をもたらす架橋結合を中心とした関節円板の生化学的分析を試みた。

1. 研究材料について

ヒト関節円板は26~85歳にわたる16症例を採取し得た。架橋構造や分子レベルからコラーゲンの変化をみていく場合、より幼若で未成熟な組織を分析し、そこから加齢変化を追及していくことが重要であろうと考えるが、本研究に際しては幼若検体からの試料を得ることができなかった。そこで、ヒトに類似した咬合様式を有するブタを用い、物理的年齢の低い動物における関節円板コラーゲンの特徴をとらえようと試みた。

Strömら³⁰⁾は生後1年のブタの顎関節と咀嚼筋を調べ両者の解剖学的類似性を指摘し、咀嚼系の機能研究にとってブタは有用であると述べている。ブタの生後6か月および4年がヒトのどれ位の年齢に相当するのかは明確にすることはできなかったが、すでに6か月時において

生殖可能である。

2. 水分およびコラーゲン含量について

水分含量をみると、ブタでは生後6か月、4年ともに約61%であり、ヒトでは検索した40~85歳、10検体の平均は約72%であった。両者の間には種差が考えられ、それぞれの他の組織における水分含量も考慮しなければならないと思われる。岡野³¹⁾はヒト椎間板線維輪の水分含量は20~30歳代まで減少し、以後ほとんど一定であり、髄核では生涯を通じて漸減し、概して後者の方が約10%前後高い水分含量を示したと報告している。両者のコラーゲン含量を比べると線維輪の方が多く、ブタ椎間板を調べた平野³²⁾によると、乾燥重量あたり線維輪は64.9%、髄核は5.2%である。後者は非コラーゲン性タンパク質が多いことでプロテオグリカンなどが水分の保持に関係していることが考えられ、水分含量の多い一因と思われる。ブタおよびヒト関節円板は乾燥重量あたり約80~90%のコラーゲン含量を示したが、水分含量においてはコラーゲン含量がより近い線維輪に似た増減傾向を示すものと考えられる。

アミノ酸分析の結果、ブタおよびヒト関節円板が大部分コラーゲンから構成されていることが確認され、これらのヒドロキシプロリン量からコラーゲン含量を算出したが、ブタでは年齢による増加が認められ、生後6か月では約82%、4年では約90%であった。

ヒトの骨および関節軟骨のコラーゲン含量の変化は、胎生期において著名に増加していくことが藤井ら³³⁾により示されている。すなわち、前者は胎生4か月で組織湿性重量の約4%、後者は2.4%となっているが、胎生10か月になると、骨では湿性重量の約9%、軟骨のそれは約7%にまで達する。さらに生後3歳になると骨のコラーゲン含量は湿性重量の約25%、軟骨は約20%となり、その後89歳に至るまでこれらの値はほとんど変化が認められない。本研究におけるヒト関節円板の場合、年齢による増減傾向は検索を行った26歳以上ではみられなかったが、ブタにおけるデータも考慮すると骨や関節軟骨と同様に、関節円板においてもある年齢または一定量に達してしまうとコラーゲン量は変化しないものと思われる。

ブタ関節円板において生後6か月のものに比べ4年のものではコラーゲン含量が増加していたが、これは6か月のブタ関節円板が未だ機能的に成熟していないことによるものと考えられる。

ヒト関節円板について、生化学的にコラーゲン量を求めたデータはみられないが、Thilander²⁷⁾は、14週の胎児から65歳にわたる各年代のヒト関節円板58検体について組織学的に観察し、加齢によりコラーゲン線維が増加することを報告している。また、Boucher³⁴⁾、Poswillo³⁵⁾、Barbenel³⁶⁾らは顎関節の荷重負担について解剖学的、生理学的に検索し、顎関節が負荷関節であると報告してい

るが、これらがコラーゲン量の増加と関連していることも考えられる。これらのことから、関節円板は比較的早い時期に組織の成長を遂げ、同時にその中央部は顎関節に加わる負荷の緩衝装置としての役割に相応した構造形態を備えていくものと考えられる。

関節円板に加わる負荷は、年齢、食生活、咬合状態などによって大きなバリエーションを生ずると考えられる。Ito³⁷⁾らは、咬合の変化によって顎関節にかかる負荷が異なることを報告している。本研究ではヒト検体において、生前の咬合状態に関する情報は得られず、したがって咬合と生化学的性状との関連性は検索できなかった。

3. 架橋結合について

1) 還元性架橋結合

ブタおよびヒト関節円板構成コラーゲンの還元性架橋結合のパターンはそれぞれ一定の特徴を持っており、特に、前者においては生後6か月と4年の試料において明らかな差がみられた。ブタでは関節円板、皮膚とも生後6か月と4年のものを比べると還元性架橋量の減少が認められた。還元性架橋結合は加齢により減少することが種々の組織において確かめられている^{9,38,39)}が、これらの組織も同様の傾向を示した。ヒト関節円板においては、ブタと比べて、年齢に関係なく還元性架橋量はさらに少なかった。ヒト関節円板は還元性架橋結合に関して、少なくとも検索した26歳から75歳の試料においては、加齢による変化を受けにくい組織であることが示唆された。

ヒトでは還元性物質 A1 (Hexitollysine) が、今回検索したどの年齢時においても顕著に高いピークを示した。A1 は Robins ら⁴⁰⁾ によってヘキサースとリジンがシッフ塩基で結合したものであると報告され、また、軟組織の加齢に伴って増加するともいわれている^{16,40)}。骨、軟骨、皮膚、歯肉など、他の組織における還元性架橋結合の溶出パターンと比べ、ヒト関節円板のそれは、A1 のピークが著しく高いことが特徴と思われる。他の組織に比べヒト関節円板は不溶性が高く、中性塩およびペプシン溶液に対しほとんど抽出されなかったが、この不溶性と A1 量の増加とが関連しているかもしれない。Takagi ら⁴¹⁾ はヒト象牙質コラーゲンの還元性架橋結合を調べ、象牙質形成不全症において正常よりも DHLNL が少なく A1、A2 が多いことを報告している。また、この場合正常に比べ不溶性が高く、ペプシンに対してほとんど溶解せず、ブロムシアン分解でも分解率が低いと述べている⁴²⁾。現時点において A1 の詳細は明らかでなく、今後の検討が必要であろう。

久保木ら^{16,18,19)}により、DHLNL/HLNL の比は幼若で活発にコラーゲンの合成と線維形成を行っている組織ほど高い値となり、また、骨や象牙質などの硬組織では DHLNL の方が多く、この値は1以上となり、歯肉、

歯根膜、歯髄、皮膚などの軟組織は1以下と報告されている。さらに彼は、皮膚などの軟組織においても、胎生期または非常に幼若でコラーゲン合成の旺盛な時期にはDHLHL/HLNLの比が高い事実から、石灰化組織では幼若で活発に形成された直後の線維がそのままミネラルの中に閉じ込められて凍結された結果であると考察している。ブタの場合、関節円板は皮膚に比べて値が大きく、生後6か月時で1、4年時においても0.97を示し、硬組織に近い値を示した。しかし、ヒトの関節軟骨、骨についての藤井ら⁴³⁾の報告によると、DHLNL/HLNLの比の値は前者では年齢による変化がみられず約6、後者の場合3歳で3.3、加齢により減少し、32歳で1.6、89歳では1.1であった。また、大坪⁴⁴⁾はヒト正常顎骨(13~47歳)および智歯部歯肉(15~48歳)の還元性架橋結合を検索し、そのDHLHL/HLNLの比は、前者では0.4~1.2、後者では1.1~1.7であり、加齢による増減関係は特にみられなかったと述べている。

今回検索したヒト関節円板ではDHLNL/HLNLの比は0.35~0.82であり、いずれも軟組織に特有の値を示した。大穿孔のある50歳の症例の関節円板では、DHLNL/HLNLの比は0.82と他よりも高い値であったが、これは穿孔部周囲にわずかに残存した円板組織を分析したためと考えられる。また、これらの値よりヒト関節円板の代謝活性は低いと考えられるが、このことは少なくとも成人以降、正常な関節円板では線維組織の改変が起りにくいということを示していると考えられ、実際、血管を含まず、関節液のみから栄養供給を受けている関節円板中央部の解剖学的環境からも示唆されると思われる。

2) 非還元性架橋結合について

本研究ではアミノ酸分析計を用いて、非還元性架橋結合ビリジノリンおよびコラーゲン関連タンパク質架橋結合ヒスチジノアラニンの直接定量を行った。

ビリジノリンは1977年、Fujimotoら²⁴⁾によってウシのアキレス腱のコラーゲンから蛍光性を有する架橋アミノ酸として単離された成熟架橋である。ラットおよびヒトの肋軟骨、アキレス腱のビリジノリン含量を調べたMoriguchiら⁴⁵⁾によると、ラットでは出生直後のコラーゲンにビリジノリンはほとんど含まれないが、成長とともに増加がみられ、一方、ヒトでは出生から20歳頃まで急増し、30歳頃より減少がみられたとのことである。

ビリジノリンは、本来P-celluloseカラムを通し、さらに蛍光測定を行って同定することが望ましいが、試料の量的問題もあり、本研究では標準物質との溶出位置の一致を十分に確認して行った。

本研究で用いたブタにおけるビリジノリン量は、ヒドロキシプロリン300nmol当たり、生後6か月で0.67nmol、4年で0.47nmolとやや減少がみられた。ヒトの値と比較したビリジノリン量の変化からも、生後6か

月のブタはすでに成熟期に達していることが示唆される結果となった。また、ヒトにおいては加齢に伴ってビリジノリン量の減少傾向がみられ、関節円板においても成熟期以降、本架橋が減少するものと考えられた。

DHLNL、HLNLおよびビリジノリン以外の各種の架橋については、動物の加齢に伴ってどのように変化するのか、正確にはほとんどわかっていないのが現状であるが⁴⁶⁾、ヒトおよびブタのビリジノリン量の差異は、さほど大きくないにもかかわらず、還元性架橋結合において両者は著しく異なる溶出パターンを示した(表3、5)。このことは、ヒト関節円板では幼若な架橋から、ビリジノリンを含めた未同定の成熟架橋⁴⁷⁾あるいは老化架橋といわれるようなものへといちはやく転換が進み、それらが関節円板の機械的強度と不溶性に寄与していることが考えられる。関節円板は関節液に浸って存在しているが、その環境下で二次的にさらに複雑な架橋形成が行われるであろうことが推察される。顎関節液の成分、機能的役割についてはいまだ詳細は不明であり、今後の課題であろう。

ヒスチジノアラニンは1982年、Fujimotoら⁴⁸⁾によってヒト象牙質中に発見された架橋アミノ酸で、その後軟骨や動脈壁などでも発見された⁴⁹⁾。当初はコラーゲン間の架橋であると予想されたが、Kubokiら²⁰⁾により、象牙質においてはリンタンパク質の成分であることが確認され、以後コラーゲンと他のタンパク質との架橋であると考えられるようになっていく。ヒスチジノアラニンの存在に関しては、ある種の二枚貝に多く存在すること⁵⁰⁾、顎口腔領域の軟組織、硬組織疾患中に存在すること⁴⁴⁾が報告されているが、いまだ不明な点も多い。本研究において、ブタおよび26歳、40歳のヒトでは検出限界以下であったが、老化によって出現し、穿孔部周囲の円板組織に多く存在することが認められた。これらは関節円板を構成するコラーゲンと、その中に存在するわずかな非コラーゲン性タンパクと結合していると考えられるが、今後、この架橋の性質が明らかにされるにつれ、本データもより有意となるであろうと思われる。

4. コラーゲン型分析について

ブロムシアンペプチドの電気泳動による型分析により、ヒト関節円板はⅠ型から、ブタではⅠ型と極く少量のⅢ型から構成されていることが認められた。ヒト膝関節半月板がⅠ型から構成されていることは、平野³²⁾、進藤ら⁵¹⁾によって報告されている。おのおの、組織をペプシン消化しており、前者の報告では14歳の膝半月板で38.6%、45歳で5.2%、後者では若年成人群で20~30%、高齢者群で3~5%と、低いながらも抽出されている。本研究において、ヒトの関節円板組織から型分析可能なコラーゲンはペプシンではほとんど抽出されなかった。この抽出率の差は顎関節円板と膝半月板の組織の違いに由来するものかと思われる。すなわち、顎関節腔を

二分するとともに下顎頭の前方滑走に伴って大きく前方に移動する関節円板と、内・外側の大腿骨頭と脛骨上関節面との間の周辺部に介在し、それぞれ内側半月板、外側半月板とから構成される膝半月板とでは、構造的、機能的にかなりの差異があり、このような機能上の相違に対応した組織構造の違いが抽出上の違いになっているものと考えられる。また、前述した関節円板構成コラーゲンに特異的に多い還元性物質 A1 の存在が、不溶性に関連しているものと思われる。

ブタ関節円板のペプシン可溶性コラーゲンの途中還元ゲル電気泳動像では $\alpha 1$ (III) のバンドはみられなかったが、ブロムシアノ分解により、わずかであるが $\alpha 1$ (III)-C-B-5, 9 のバンドが検出された。これは、抽出(分解)率の違いによるものであると思われる。また、アミノ酸分析の結果、おのおのの試料にはシスチンが数残基存在したが、これは III 型コラーゲン由来であると思われる。このことから、ヒト関節円板の場合もわずかな III 型存在の可能性が考えられる。

Hirschmann ら¹¹⁾は、ウシ胎児の関節円板は I 型および II 型から成っているが、III 型は試料採取時における周囲滑膜の混入であると考察している。今回、ブロムシアノペプチドの電気泳動像からブタ関節円板でわずかな III 型の混入がみられたが、試料採取部位から考えて関節円板固有のものであると思われる。また、得られた電気泳動像をデンストメーターにて測定したが、明確なピークを得られず、I 型に対する III 型の割合を求めることはできなかった。

5. 関節円板の穿孔について

関節円板の穿孔の原因としては、歯牙欠損に起因する円板への応力の変化や損傷、栄養状態の変化などが考えられている⁵²⁾。近年、剖検などによって円板に穿孔がみられる率は、Lietberg ら⁵³⁾によると 28%、木野ら⁵⁴⁾は 19.2% である。本研究に際して採取したヒト関節円板は合計 16 検体であり、このうち 75 歳の症例では円板関節面外側部に、さらに 50 歳の症例において円板のほぼ全体に及ぶ穿孔が観察され、その割合は 12.5% であった。

75 歳の症例において、穿孔部周囲組織をさらにその周囲の円板組織と分けて採取し分析したが、穿孔部周囲とさらにその周囲組織とでは、還元性架橋結合について明確な差異は認められなかった。これは還元性架橋結合量に関連していると思われる。すなわち、このような年齢では還元性架橋結合量が著しく減少しているために、明確な変化として現れなかったものと考えられる。

これに代わって、コラーゲン関連タンパク質架橋結合であるヒスチジノアラニンが老化に伴って出現し、また、穿孔部周囲で多く認められたことは、穿孔部に比較的多くみられる類軟骨細胞(図 10 a, b)と関連して興味深い。組織学的には、加齢によって関節円板のコラーゲン線維間にこの類軟骨細胞が単独、あるいは数個ずつ

図 10 a 穿孔を伴うヒト関節円板の組織標本(H-E染色, $\times 20$)

図 10 b 穿孔部周囲組織の拡大像(H-E染色, $\times 33$)
類軟骨細胞がみられる(矢印)

列をなして存在するようになるとされ、これは腱や靱帯の付着部において加齢とともに生じる変化と同様であり、生理的なものであると考えられている⁵⁵⁾。これらの変化が関節円板の穿孔とどのような関わりを持っているのかは現在のところ不明であるが、老化に伴って増加するヒスチジノアラニンが、円板穿孔部周囲において類軟骨細胞の出現とともに増加したことは、このような病的円板組織が加齢に伴う変化と同様な変化を加速していることを示唆しているものと考えられた。

結 論

ヒトおよびブタ関節円板を構成するコラーゲンについて生化学的な分析を行い、次のような結果を得た。

1. ブタ関節円板の水分含量は生後 6 か月、4 年において、ともに約 61% であった。40~85 歳にわたる 10 検体について検索したヒトでは平均すると約 72% であり、これらは特に年齢的な変化は認められなかった。

2. アミノ酸分析の結果、関節円板は大部分コラーゲンより構成されていることが確認された。ブタおよびヒ

ト関節円板の全タンパクに占めるコラーゲンの割合は、前者では年齢的な変化を示し、生後6か月で乾燥重量あたり約82%，4年で約90%であった。ヒトでは26～85歳，12検体を調べたが，加齢による有意の増減傾向はみられず，平均約87%であった。

3. 関節円板を構成するコラーゲンは大部分不溶性であり，特にヒト関節円板は中性塩およびペプシン溶液に対してほとんど抽出されなかった。ブロムシアン分解によってブタ関節円板は90%以上分解されたが，ヒト関節円板の分解率は，検索した26～75歳では30.3～58.0%と低かった。

4. 還元性架橋結合のパターンをみると，ブタ関節円板ではDHLNLおよびHLNLが加齢により顕著な減少を示した。ヒト関節円板ではこれら還元性架橋のピークは低く，還元性物質であるA1がきわめて多量に存在し，26歳以上の年齢層では加齢による変化は特に認められなかった。DHLNL/HLNLの比は，ブタ関節円板では生後6か月，4年ともに約1であり，ヒトでは0.35～0.65を示した。

5. ビリジノリンはブタ，ヒト関節円板においてそれぞれ加齢により減少した。ヒスチノアラニンがブタおよび40歳までのヒト関節円板では検出限界以下であり，老化に伴って検出された。

6. ブタ関節円板はⅠ型コラーゲンとわずかなⅢ型コラーゲンから，また，ヒト関節円板はⅠ型コラーゲンより構成されていた。

7. 75歳の症例でみられた穿孔部周囲の円板組織は他に比べヒスチノアラニンが増加しており，組織学的に穿孔部周囲に多くみられる類軟骨細胞との関連が示唆された。

稿を終えるにあたり，ご指導とご校閲を賜りました塩田重利教授，ならびに歯学部生化学教室，佐々木哲教授に深甚なる感謝の意を表するとともに，終始懇切丁寧なご教授とご校閲を賜りました北海道大学歯学部生化学教室，久保木芳徳教授に衷心より感謝を捧げます。

また，本研究に際し，多大なるご助言，ご鞭撻をいただきました当教室木野孔司博士，ノースキャロライナ大学，津崎まり博士に深謝致します。

さらに，種々のご援助をいただきました歯学部附属病院検査部，歯学部生化学教室，北海道大学歯学部生化学教室ならびに当教室の諸先生方に厚くお礼申し上げます。

引用文献

- 1) 上野 正：顎関節症の病因と治療，昭和歯誌 2: 121-130 1983.
- 2) 高橋庄二郎，柴田孝典：顎関節症の基礎と臨

床，第1版，日本歯科評論社，東京，1986，1-22頁。

- 3) Scapino, R.P.: Histopathology associated with malposition of the human temporomandibular joint disc. *Oral Surg* 55: 382-397 1983.
- 4) Isacsson, G., Isberg, A., et al.: Internal derangement of the temporomandibular joint: Radiographic and histologic changes associated with severe pain. *J Oral Maxillofac Surg* 44: 771-778 1986.
- 5) 岩田 久，寺島洋治，他（中川 正監修）：結合組織と疾患，第1版，講談社，東京，1984，3-19，82-86頁。
- 6) Oschold, W.R. and Pedrini, V.: Pepsin-solubilized collagen of human nucleus pulposus and annulus fibrosus. *Biochem Biophys Acta* 434: 390-405 1976.
- 7) Eyre, D.R. and Muir, H.: Type I and II collagens in intervertebral disc: Interchanging radial distributions in annulus fibrosus. *Biochem J* 157: 267-270 1976.
- 8) Eyre, D.R. and Muir, H.: Quantitative analysis of type I and II collagens in human intervertebral discs at various ages. *Biochem Biophys Acta* 492: 29-42 1977.
- 9) Fujii, K., Kuboki, Y., et al.: Aging of human bone and articular cartilage collagen. *Gerontology* 22: 363-370 1976.
- 10) Granström, G. and Linde, A.: Glycosaminoglycans of temporomandibular articular discs. *Scand J Dent Res* 81: 462-466 1973.
- 11) Hirschmann, P.N. and Shuttleworth, C.A.: The collagen composition of the mandibular joint of the calf. *Archs Oral Biol* 21: 771-773 1976.
- 12) Miller, E.J. and Matukas, V.J.: Chick cartilage collagen: A new type of $\alpha 1$ chain not present in bone or skin of the species. *Proc Natl Acad Sci USA* 64: 1264-1268 1969.
- 13) Miller, E.J.: Chemistry of the collagens and their distribution. Piez, K.A. and Reddi, A.H.: *Extracellular Matrix Biochemistry*, 1st Ed, Elsevier Science Publishing Co, New York, 1984, p 41-81.
- 14) 久保木芳徳：口腔組織コラーゲンの生化学，浜田茂幸編：う蝕と歯周病，第2巻，第1版，日本歯科評論社，東京，1982，199-243頁。
- 15) 畑 隆一郎：コラーゲン—その機能と代謝—蛋白質，核酸，酵素 31: 29-52 1986.
- 16) 久保木芳徳，津崎まり，他：組織生化学検査法(Ⅱ)—結合組織をどう扱うか—，*歯科ジャーナル* 21: 355-363 1985.
- 17) 三澤常美：サル顎関節円板における実験的微小損傷の治療経過に関する組織学的観察，*口病誌* 49: 211-238 1982.

- 18) Kuboki, Y., Takagi, T., et al.: Comparative collagen biochemistry of bovine periodontium, gingiva, and dental pulp. *J Dent Res* 60: 159-163 1981.
- 19) 久保木芳徳：架橋の分析，永井 裕，藤本大三郎編：コラーゲン実験法，第1版，講談社，東京，1985，119-234頁。
- 20) Kuboki, Y., Fujisawa, R., et al.: Presence of lysinoalanine and histidinoalanine in bovine dentin phosphoprotein. *Calcif Tissue Int* 36: 126-128 1984.
- 21) Sykes, B., Puddle, B., et al.: The estimation of two collagens from human dermis by interrupted gel electrophoresis. *Biochem Biophys Res Commun* 72: 1472-1480 1976.
- 22) 久保木芳徳，下川仁弥太，他：コラーゲンの架橋結合の分析法—歯牙形成機序への一つのアプローチ— *歯界展望* 44: 97-104 1974.
- 23) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685 1970.
- 24) Fujimoto, D., Akiba, K., et al.: Isolation and characterization of a fluorescent material in bovine achilles tendon collagen. *Biochem Biophys Res Commun* 76: 1124-1129 1977.
- 25) 木野孔司，大西正俊：顎関節の解剖—関節腔内壁表面の形態とその組織構造— *歯科ジャーナル* 16: 767-776 1982.
- 26) Rees, L.A.: The structure and function of the mandibular joint. *Br Dent J* 96: 125-133 1954.
- 27) Thilander, B.: The structure of the collagen of the temporomandibular disc in man. *Acta Odont Scand* 22: 135-149 1964.
- 28) Keith, D.: Development of the human temporomandibular joint. *Br J Oral Surg* 20: 217-224 1982.
- 29) Morimoto, K., Hashimoto, N., et al.: Prenatal developmental process of man temporomandibular joint. *J Prosthet Dent* 57: 723-730 1987.
- 30) Ström, D., Holm, S., et al.: Gross anatomy of the mandibular joint and masticatory muscles in the domestic pig (SUS SCROFA). *Archs Oral Biol* 11: 763-768 1986.
- 31) 岡野 正：椎間板の物理化学的性状に関する実験的並びに臨床的研究。特に親水性に就て。 *千医会誌* 36: 270-301 1960.
- 32) 平野秀夫：線維性軟骨コラーゲンの特徴—特に脊椎椎間板のコラーゲンタイプについて— *中部整災誌* 21: 664-678 1978.
- 33) 藤井克之，梶原敏英，他：骨，関節軟骨の老化とコラーゲン。 *整形外科* 32: 416-424 1981.
- 34) Boucher, L.J.: Anatomy of the temporomandibular joint as it pertains to centric relation. *J Prosthet Dent* 12: 464-472 1962.
- 35) Poswillo, D.: Experimental investigation of the effects of intra-articular hydrocortisone and high condylectomy on the mandibular condyle. *Oral Surg* 30: 161-173 1970.
- 36) Barbenel, J.C.: The mechanics of the temporomandibular joint—a theoretical and electromyographical study. *J Oral Rehabilitation* 1: 19-27 1974.
- 37) Ito, T., Gibbs, C.H., et al.: Loading on the temporomandibular joints with occlusal conditions. *J Prosthet Dent* 56: 478-484 1986.
- 38) 高木 亨，斉藤 滋，他：歯根膜，歯肉，および歯髓コラーゲンの加齢変化について。 *歯基礎誌* 17: 432-441 1975.
- 39) 須佐美隆史：家兎口蓋粘膜コラーゲンの加齢および創傷治療に伴う生化学的变化。 *歯基礎誌* 27: 64-79 1985.
- 40) Robins, S.P. and Bailey, A.J.: Age-related change in collagen: The identification of reducible lysinecarbohydrate condensation products. *Biochem Biophys Res Commun* 48: 76-84 1972.
- 41) Takagi, Y., Koshiba, H., et al.: Dentinogenesis imperfecta: evidence of qualitative alteration in the organic dentin matrix. *J Oral Pathol* 9: 201-209 1980.
- 42) Takagi, Y. and Veis, A.: Matrix protein difference between human normal and dentinogenesis imperfecta dentin. Veis A.: *The Chemistry and Biology of Mineralized Connective Tissues*. Elsevier-North-Holland, Amsterdam, 1981, p 233-243.
- 43) 藤井克之，久保木芳徳，他：ヒト骨および関節軟骨コラーゲンの老化の研究—cross-linkとそのprecursorの変化について— *骨代謝* 7: 80-87 1973.
- 44) 大坪和則：顎口腔領域に生じる結合組織の増殖を主体とする疾患の生化学的ならびに組織学的研究—コラーゲン架橋結合および型分析について— *鶴見歯学* 13: 109-126 1987.
- 45) Moriguchi, T. and Fujimoto, D.: Age-related changes in the content of the collagen cross-link, pyridinoline. *J Biochem* 84: 933-935 1978.
- 46) 津崎まり：ウシ象牙質コラーゲンにおける非還元性架橋—ピリジノリン含有ペプチドの単離とそれらの諸性質について— *口病誌* 50: 418-432 1983.
- 47) Barnard, K., Light, N.D., et al.: Chemistry of the collagen cross-links. Origin and partial characterization of a putative mature cross-link of collagen. *Biochem J* 244: 303-309 1987.

- 48) Fujimoto, D., Hiramata, M., et al.: Histidinoalanine, a new crosslink amino acid in calcified tissue collagen. *Biochem Biophys Res Commun* 104: 1102-1106 1982.
- 49) Fujimoto, D.: Aging and cross-linking in human aorta. *Biochem Biophys Res Commun* 109: 1264-1269 1982.
- 50) Marsh, M.E.: Histidinoalanine, a naturally occurring cross-link derived from phosphoserine and histidine residues in mineral-binding phosphoproteins. *Biochemistry* 25: 2392-2396 1986.
- 51) 進藤裕幸, 軽部俊二, 他: ヒト関節軟骨および膝半月コラーゲンの加齢と疾患における生化学的研究. *日整会誌* 55: 17-30 1981.
- 52) Weizengreen, H.H.: Observation of the articular disc. *Oral Surg* 40: 113-121 1975.
- 53) Lietberg, J. and Westesson, P.: Diagnostic accuracy of upper compartment arthroscopy of the temporomandibular joint: Correlation with postmortem morphology. *Oral Surg* 62: 618-624 1986.
- 54) 木野孔司, 泉 祐幸, 他: 屍体顎関節にみられた関節円板穿孔についての検討. *顎関節研究会誌* 5: 19 1984.
- 55) Öberg, T.: Aging of the temporomandibular disk with special reference to the occurrence of cartilaginous cells. *Odontol Tidskr* 74: 122-129 1966.