ヒト顎関節液の分析と顎関節症の臨床診断について
 ——顎関節液中のタンパク質成分と症状の関係について——

鄭 勲

**Biochemical analysis of temporomandibular synovial fluid and
 clinical diagnosis of the temporomandibular arthrosis**

——A protein fraction in synovial fluid in human temporomandibular joint——

Hoon CHUNG

Abstract: Biochemical studies on synovial fluid in the temporomandibular joint are rather rare when compared with those in the orthopedic field. In the orthopedic, several biochemical studies on synovial fluid have been reported such as the study of the proteins, sugars, enzymes, etc. So the author attempted to analyze synovial fluid in the temporomandibular joint and the data were compared with the clinical symptoms.

Objects were 10 normal and 60 pathologic samples of temporomandibular joints synovial fluid.

Synovial fluid was collected from upper joint cavity by pumping 3 times with 2 ml of 2 % Xylocaine. Click or pain in the temporomandibular joint area and changes in the maximum interincisal distance before and after cavity pumping were checked and Orbito-ramus, Schüller projection and arthrogram were taken. Collected synovial fluid was centrifuged at 3,000 rpm for 10 min, and the supernatant was obtained for analysis. Total protein amount, immunoelectrophoresis, SDS-electrophoresis, and calculation of the albumin/globulin (A/G) ratio from the SDS-electrophoretograms were performed. In addition, gel filtration and ion exchange chromatography, amino acid analysis, immunoblotting method were performed for biochemical study. Correlation coefficient between the biochemical results and clinical data was calculated using a statistic analysis program.

The results were as follows; Average of total protein amounts was 1,259 $\mu\text{g/ml}$ in the pathologic synovial fluid, in contrast to 205 $\mu\text{g/ml}$ in the normal. Albumin appeared in normal fluid, but albumin, transferrin and IgG were found in the pathologic fluid by the immunoelectrophoresis. A/G ratio of pathologic synovial fluid was 2.26 which was close to that of serum (1.2-2.1). A protein of 78 k in molecular weight, which was not found in normal synovial fluid or serum, appeared in pathologic synovial fluid in the SDS-electrophoresis. This 78 k protein had a tendency to appear when there were pathologic changes in upper joint cavity. (84%). But in the some cases (16%), this protein did not appear in spite of pathologic changes in upper joint. From the results of clinical examination, those cases without 78 k protein had a tendency to have chronic or fixed symptoms. By statistic analysis, correlation coefficient between the appearance of 78 k protein and incidence of disk deformity was 0.58.

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 and Maxillofacial
 Surgery, Faculty of Dentistry, Tokyo Medical and

Dental University (Chief and Director: Prof.
 Shigetoshi Shioda)

受付日: 昭和63年9月25日

This result indicated that disk deformity may have some relation to 78 k protein appearance.

Key words: TMJ synovial fluid (顎関節液), pathologic change (器質的变化), 78 k protein (78 K タンパク質)

緒言

顎関節疾患の臨床診断は、問診に始まり、疼痛部位、開口域の大きさ、咬合状態の診査といった視診、また、疼痛部位および下顎頭の運動状態と雑音を調べるための触診などにより、臨床症状の把握と原因事項の推論につとめるとともに、さらに各種検査を用いて顎関節内の病態を明確化することによってなされている。一般に行われている検査法はX線による顎関節形態の撮影法である。

このようなX線撮影法では眼窩一下顎枝 (Orbito-Ramus) 方向撮影法や Schüller 法などによる単純撮影法が主である¹⁻³⁾。単純X線撮影法は簡便な方法であるので広く利用されているが、顎関節は頭蓋骨などとの重複がみられるため、読影に困難を生じる場合がある。

近年、顎関節疾患、とくに顎関節症の病態として顎関節円板の前方転位^{4,5)}といった軟組織部分の変形が注目されるようになった。このような軟組織の観察のためには関節腔の造影撮影が行われており⁶⁻¹²⁾、これにより円板変形の程度がはっきりになり、病期に従った治療法の選択がなされている。この顎関節造影法は、その後、関節腔内への穿刺法の応用から、関節腔内を直接観察する顎関節鏡視法¹³⁻¹⁶⁾へと発展してきている。さらに、最近ではX線被曝や関節腔穿刺に伴う内部損傷の危険を考慮して、Magnetic Resonance Imaging (MRI 法)¹⁷⁻²⁰⁾による顎関節の映像化も試みられている。

MRI 法は硬組織と軟組織の双方を映像化するという利点があるが、現在のところ顎関節のような小領域での硬組織、軟組織の明瞭な映像化にはまだ不十分であり、そのための顎関節用の表面アンテナ²¹⁻²⁴⁾の工夫といった高解像度化の努力がなされているのが現状である。

これらのX線撮影法をはじめとして、画像診断が目指すところは硬軟両組織における変形などの器質的变化を見い出して、診断、治療に役立てることである。しかし、顎関節における骨形態の変化に関して、現在行われている各種の画像診断法では、加齢に伴ういわば生理的な変形と、現実患者を苦しめている病的な変形との判別が困難な場合もしばしばみられる。したがって、画像診断法のみではなく、他の補助診断手段が持たれているのが現状である。これについては整形外科領域において、関節内部に病変が存在する場合、関節液中に異常なタンパク質や、ムコ多糖などが出現することが知られている²⁵⁻²⁸⁾。しかしながら、顎関節疾患における関節液については生化学的検索はこれまでほとんどなされてい

表 1 検査対象

年齢 (歳)	男 性	女 性	計
10～19	1	14	15
～29	2	12	14
～39	0	4	4
～49	0	10	10
～59	2	7	9
～69	1	5	6
～79	2	0	2
	8	52	60

男性：女性＝1：6.5

い²⁹⁾。そこで、本研究は顎関節に器質的变化が生じた場合、関節腔を満たしている関節液にも何らかの変化があるものと考え、顎関節疾患の関節液について、疾患の程度による生化学的差異を検索するとともに、これらと臨床症状との相関関係について検討した。

材料ならびに方法

1. 研究材料

対象は、顎関節に異常を訴えない正常例、男性 6 例、女性 4 例計 10 例と、東京医科歯科大学歯学部第 1 口腔外科外来を訪れた患者のうち、顎関節になんらかの異常を訴え臨床的に顎関節症と診断された 16 歳から 71 歳までの男性 8 例、女性 52 例計 60 例の顎関節液を用いた (表 1)。

2. 研究方法

1) 上関節腔内における器質的变化の臨床的検索
病歴および現症を記録したのち、顎関節について眼窩一下顎枝方向撮影法と Schüller 法による単純X線撮影を行い、骨性部分の変形を検索したのち、2%キシロカインによる上関節腔局麻前後の最大開口域の変化の測定³⁰⁾、ウログラフィン 76%を用いた上関節腔造影を行い、下顎窩、関節結節を被う線維性被膜、および円板などの軟組織部分の変化を検索した。

これらの諸検索の結果、造影を含む単純撮影写真における変化の有無、局麻後の最大開口域 40 mm を基準³⁰⁾にして、これらを勘案した関節腔内の器質的变化の程度を、著明(+), 中等度(±), なし(－)に分別し、臨床的評価の基準とした (表 2)。

2) 顎関節液の採取ならびに調整
顎関節液の採取は大西ら⁶⁾の方法に準じ、2%キシロ

表 2 上関節腔における器質的变化度

	造影を含む単純撮影における変化	局麻後の最大開口域
著明(+)	あり	40 mm 以下
中等度 (±)	なし	
	あり	40 mm 以上
なし(-)	なし	

カイン 2 ml を満たした注射筒を用いて外眼角と耳珠中点を結ぶ線上の耳珠中点から約 10 mm の位置で、直角に 5 mm 刺入したのち、針を上関節腔結節後斜面に向け顎関節腔内に挿入した。

関節腔に到達後、2%キシロカイン 2 ml による緩圧化でのパンピングを3回行い、関節液をキシロカイン溶液に混入させた状態で回収し、これを顎関節液試料として用いた。

顎関節液は採取後ただちに不溶物ならびに血球などを除去するために 3,000 rpm, 10 分にて遠心し、その上清について検索した。

3) 顎関節液の総タンパク質量測定

顎関節液中の総タンパク質含有量は色素法³¹⁾により測定した。呈色試薬 (CBB-G 250 含有塩酸性溶液、大塚製薬) 3 ml に試料ならびに標準溶液 (ヒト血清アルブミン) 50 μ l を加え、攪拌後 5 分放置し、590 nm にて測定 (島津製作所, UV-730), 検量線よりタンパク濃度を求めた。

4) 免疫電気泳動

免疫電気泳動は大谷ら³²⁾の方法に準じて行った。顎関節液をペロナール緩衝液により作成した寒天板 (0.9 g/100 ml, Agar Noble, Difco 社) を用い電気泳動 (80 V, 1.5 hr) を行った。泳動終了後、ヤギ抗ヒト全血清 (Cappel 社) を用い反応させた。反応終了後、染色は Amidoblack 10 B 0.5 g/Methanol 50 ml/Acetic Acid 10 ml/精製水 40 ml によって行った。脱色は酢酸溶液 (Acetic acid 5 ml/精製水 95 ml) を用いた。

5) SDS 電気泳動

顎関節液 50 μ l を凍結乾燥したのち、試料用緩衝液 (1% SDS, 10% Glycerol, 0.1% 2-mercaptoethanol, 0.001 M EDTA, 6 M Urea および 0.1% bromphenol blue を含む 0.01 M トリス緩衝液 PH 8.0) 20 μ l にて溶解後、4°C, 24 時間で SDS 化したものを電気泳動に供した。SDS 電気泳動は Laemmli の方法³³⁾に準じ行った。

0.1% SDS を含む 7.5~20%濃度勾配によって作成したアクリルアミドゲルに、試料を加えた後、0.05 M トリス-グリシン緩衝液にて 10 mA, 9 時間泳動した。また、既知の分子量標準としては Electrophoresis Calib-

ration Kit (Pharmacia 社), 1) Phosphorylase b (94 k), 2) Bovine Serum Albumin (67 k), 3) Ovalbumin (43 k), 4) Carbonic Anhydrase (30 k), 5) Soybean Trypsin Inhibitor (20.1 k), 6) α -Lactalbumin (14.4 k) の混合物を用いた。

染色法は Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB, Bio-Rad 社)³⁴⁾および銀染色法³⁵⁾を用いた。

染色した泳動像は画像処理装置 (電気泳動タンパク定量プログラム, TIB-100 型, イムノメディカ社) にて画分の相対量を算出した。

6) タンパク質精製とアミノ酸分析

顎関節液はゲル濾過クロマトグラフィー (Sephacryl S-200, 25 $\times$ 95 mm) により分画した。関節液中に含まれる特異的分画については DEAE-Sephacel によるイオン交換クロマト、および 7.5~20% SDS-電気泳動により分析を行った。タンパク質成分の抽出はゲルの一部を CBB 染色し、該当するゲル部分を切り取り、Max-Yield タンパク質回収器 (アトー社, AE-3590)^{36~38)} を使用し トリス-ホウ酸緩衝液を用い、500 V, 90 分にて通電し、試料を回収した。試料は Sephadex G-10 (1.5 $\times$ 10 cm) によるカラムクロマトグラフィーにて脱塩後、凍結乾燥した。

アミノ酸分析については 5.7 N 塩酸にて (0.1% SnCl₂ 含む) 室素置換後減圧封管し、110°C 24 時間加水分解後、エバポレーターにて濃縮乾固したのち、アミノ酸分析 (ベックマン社 6300 型) に供した。

7) Immunoblotting 法による検索

SDS-電気泳動後、Towbin らの方法³⁹⁾により Western blotting を行った。電気泳動終了後のアクリルアミドゲルはニトロセルロース膜 (pore size 0.45 μ m, Bio Rad 社) を用い、25 mM トリス-グリシン/20%メタノール緩衝液 (pH 8.7) にて 30 V, 40 分転写した (トランスプロット装置, Bio-rad 社)。転写後のニトロセルロース膜は、10 mM TBS 緩衝液 (0.9% NaCl を含む, pH 7.4) 中 3%ウシ血清アルブミンにて 25°C, 1 時間ブロッキングしたのち、TBS 緩衝液で 500 倍に希釈したウサギ抗ヒト全血清抗体 (Cappel 社) またはウサギ抗ヒトトランスフェリン抗体 (Dako 社) を用いて 25°C, 40 分間インキュベートした。二次抗体による反応は TBS 緩衝液で 3 回洗浄したのち、HRP (Horse-radish Peroxidase) で結合したヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Cappel 社) を TBS 緩衝液にて 1,000 倍に希釈したもので 40 分間反応させた。反応終了後は TBS 緩衝液で 3 回洗浄したのち基質溶液 (4-Chloro-1-naphthol, 30 mg/Methanol, 10 ml に TBS 50 ml/30% H₂O₂, 100 μ l) にて発色した。

8) 統計学的検索法

発症時に出現しているタンパク質と被験者の臨床所見 11 項目 (性, 年齢, 雑音, 開口障害期間, 顎関節部位の疼痛, 発痛点, 最大開口域, 局麻後の最大開口域, 関節

表 3 検査症例の臨床所見および生化学的データ

患者 No.	性	年 齢	雑 音	開口 障害 期間 (年)	顎関節 位の 疼痛	発 痛 点 (mm)	最大 開口 域 (mm)	局麻後 最大 開口域 (mm)	X線による			上関節腔 の質 的 変 化	78kタン パク質の %	総タンパク 質 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	A/G 比
									関節 円板 の 変化	関節 結節 の 変化	下顎 頭の 変化				
1	女	26	—	7	+	23	27	35	+	—	+	+	4.91	1,300	1.69
2	女	37	—	5	+	30	31	36	+	+	+	+	3.34	960	0.61
3	女	19	+	0.1	—	—	33	35	+	—	+	+	4.12	1,900	1.50
4	女	44	—	5.6	+	35	35	42	±	—	+	±	1.16	1,240	0.39
5	女	58	—	1	+	22	32	42	—	—	—	—	0.12	500	0.52
6	女	50	+	0.8	+	28	33	40	+	—	+	+	5.75	3,600	0.56
7	女	52	—	0.5	+	30	35	42	—	—	—	—	0.35	2,740	0.86
8	女	44	—	5.5	+	37	37	40	+	—	+	+	1.39	440	1.07
9	女	16	+	1.2	+	20	22	25	+	+	+	+	5.04	700	1.06
10	女	16	+	0	—	—	42	44	—	—	—	—	0.37	1,040	1.24
11	女	44	—	0.5	+	41	42	44	—	—	—	—	0.59	1,940	0.69
12	女	44	—	5.6	+	39	39	42	±	—	+	±	0.81	700	2.30
13	女	22	—	0	—	40	53	54	—	—	+	—	0.12	420	23.35
14	女	43	+	0.2	+	41	41	43	+	—	+	+	0.01	—	4.13
15	女	19	—	1.1	+	38	39	50	—	—	+	—	0	—	1.69
16	男	57	—	0.1	+	32	32	45	—	—	—	—	0	360	2.27
17	女	44	+	3.5	+	37	42	44	+	—	+	+	4.55	2,400	0.58
18	女	67	—	0.2	+	30	30	30	±	—	+	+	0.55	500	0.60
19	女	62	+	1.5	+	25	25	38	±	+	+	+	0.35	—	0.48
20	女	54	+	0.7	+	30	35	37	+	—	+	+	3.48	—	1.10
21	女	20	+	1	+	15	38	39	+	—	+	+	3.10	—	0.80
22	女	41	+	1.5	+	25	27	30	+	—	+	+	4.13	—	0.54
23	女	19	—	2.5	+	24	25	25	±	—	—	+	0.43	—	1.07
24	男	63	—	2.0	—	—	28	30	+	+	+	+	0.80	—	1.66
25	女	19	—	2.5	+	34	38	41	—	—	—	—	0.82	—	4.90
26	女	59	—	2	+	32	34	38	+	—	+	+	3.82	—	1.15
27	女	60	—	0.3	+	21	25	28	+	—	+	+	3.08	—	1.48
28	男	14	+	0.1	—	—	50	54	±	—	+	±	2.87	—	0.88
29	女	60	+	0.1	+	34	34	34	+	—	+	+	3.52	—	1.39
30	女	22	—	2.5	+	30	40	47	+	—	+	±	3.05	—	2.49
31	女	23	+	2	+	30	47	48	+	—	—	±	2.51	—	2.29
32	女	60	+	0.1	+	32	32	35	+	+	—	+	2.68	—	6.25
33	女	51	—	1	—	—	38	48	—	—	—	—	0	—	10
34	男	58	—	0	—	—	51	53	—	—	—	—	0	—	9
35	女	16	+	2	+	32	32	33	+	—	+	+	3.75	—	1.5
36	女	20	+	2	+	32	36	40	+	—	+	+	2.54	—	0.66
37	女	32	+	15	+	19	20	21	+	—	+	+	0	—	2.11
38	女	15	+	0.8	+	40	47	48	±	—	+	±	1.19	—	1.09
39	女	20	+	4	—	—	42	43	—	—	—	—	0.04	—	1.75
40	女	22	+	2	+	35	40	41	+	—	+	+	2.38	—	1.21
41	女	19	—	2.5	+	36	39	43	+	—	±	±	1.77	—	0.99
42	女	17	—	2	+	20	22	22	+	+	+	+	2.94	—	1.13

表3つづき

患者 No.	性	年 齢	雑 音	開 口 障 害 期 間 (年)	顎 関 節 部 位 の 疼 痛	発 痛 点 (mm)	最 大 開 口 域 (mm)	局 麻 後 最 大 開 口 域 (mm)	X線による			上 関 節 腔 の 器 質 的 変 化	78 k タン パク質の %	総タンパク 質 ($\mu\text{g/ml}$)	A/G 比
									関 節 円 板 の 変 化	関 節 結 節 の 変 化	下 顎 頭 の 変 化				
43	女	17	—	2	+	20	22	22	+	+	+	+	2.16	—	0.98
44	女	23	+	4	—	30	32	34	+	—	+	+	2.27	—	4.42
45	女	37	+	1	+	39	41	43	+	+	—	±	1.50	—	2.73
46	男	20	—	0.5	+	39	41	42	—	—	—	—	0	—	8.55
47	男	23	—	0.6	+	35	43	43	+	—	—	±	2.09	—	1.49
48	女	20	—	0	—	40	42	45	—	—	—	—	0.25	—	1.05
49	女	20	—	0	—	40	42	45	—	—	—	—	0.18	—	3.36
50	女	58	—	2	+	26	32	38	+	—	±	+	3.00	—	0.54
51	女	19	—	0.8	+	20	24	27	+	—	+	+	0.51	—	3.70
52	女	47	+	0.5	+	41	47	48	+	—	±	±	3.5	—	0.52
53	女	48	+	0.1	—	42	47	48	—	—	—	—	0	—	0.36
54	女	16	+	2.5	+	34	35	40	+	—	+	+	2.7	—	0.47
55	女	19	—	0.9	+	25	30	38	+	—	+	+	3.2	—	0.57
56	男	70	—	0.1	+	15	20	26	±	—	+	±	3.5	—	0.71
57	男	71	—	0.2	+	16	21	25	±	—	—	±	0.5	—	0.91
58	女	33	—	1.5	+	—	28	30	+	—	+	+	3.6	—	0.73
59	女	24	+	0.5	+	22	23	26	+	—	+	+	4.1	—	0.49
60	女	47	—	0.1	+	29	42	45	—	—	—	—	0.3	—	3.4

円板の変化、関節結節の変化、下顎頭の変化)および総タンパク質量間の相関係数^{40,41)}を求めた。統計処理には統計数値計算ソフトウェアプログラム(マイクロシステム社製)を用い、Correlation table によって行った。

結 果

1. 顎関節症における上関節腔の器質的变化

造影を含む単純X線写真上の変化と局麻後の最大開口域の変化から対象症例における上関節腔内の器質的变化度を著明、中等度、なしの3つに分類した。その結果、顎関節症60例中著明に該当するものは32例、中等度は12例、なしは16例であった(表3)。

2. 顎関節液含有成分

顎関節液の採取は正常例10例と顎関節症例(以下疾患例)60例について行った。顎関節腔の容積はパンピングによる検索から正常例においては最も広いもので1.8~2.6 ml 程度であるが、疾患例においては0.8~1.9 ml と狭くなっていた。顎関節液中のタンパク量は正常例で平均 205 $\mu\text{g/ml}$ であった。これに対し、疾患例においては平均 1,259 $\mu\text{g/ml}$ であり、正常に比べ約6倍のタンパク質量を有していた。含有するタンパク質はまず抗ヒト全血清抗体を用いた免疫電気泳動によって検索した。

写真1 免疫電気泳動像

A: 正常例

B: 症例

その結果、正常例では一般的に血清抗体との反応は少なく、主要成分はアルブミンがそのほとんどであった。疾患例ではアルブミンのほかトランスフェリンやIgGが血清由来のタンパク質として存在した(写真1)。また疾患例においてはA/G比は平均2.26であり、血清の場合(1.2~2.1)に近い値であった。

3. 顎関節液のSDS電気泳動像

顎関節液の遠心上清を7.5~20%ゲルによるSDS電気泳動により含有されるタンパク質成分について検索し

写真 2 7.5~20% SDS-電気泳動像
C：クローマジー染色 A：銀染色 STA：標準タンパク質
S：血清 N：正常例 D：症例

写真 3 Immunoblotting 像
S：抗ヒト全血清抗体による像
T：抗ヒトトランスフェリン抗体による像
a, c：SDS-電気泳動のクローマジー染色像
b, d：Immunoblotting 像

た(写真2)。正常例も疾患例もともに血清成分と似たパターンを示したが疾患例では正常例や血清成分に認められないバンドが銀染色によって認められた(写真2A)。このバンドは既知の分子量から計算して分子量78,000(78k)であった。この78kに相当するタンパク質はCBB染色では疾患例によって出現する割合が異なることが示された(写真2C)。78k画分はヒト全血清抗ウサギ抗体、ヒトアルブミン抗ウサギ抗体およびヒトトランスフェリン抗ウサギ抗体を用い、イムノブロット法(Western blotting)により検索した結果、いずれに対しても反応しなかった(写真3)。

4. 臨床的諸診断による器質的变化と分子量78k画分について

臨床的諸診断から得られた変化の程度は60症例中、著明53.3%、中等度20%、なし26.7%であり、少なくとも70%は顎関節腔内に器質的变化がみられた。顎関節液の

表 4 上関節腔における器質的变化と78kタンパク質出現との関係

	上関節腔における器質的变化		
78kタンパク質	著明	中等度	なし
+	24	10	0
-	8	2	16

SDS電気泳動から求めた78kタンパク質は、銀染色の結果から正常例以外の60症例のすべてに認められた。しかしながら、CBB染色では全タンパク量の1%以上存在するもので著明および中等度に相当するものは57%であった。また、78kタンパク質が全タンパク質量の1%以下のもので著明および中等度に該当するものは16%存在し、なしのものでは27%であった(表4)。この結果、78kタンパク質が1%以下で著明および中等度に該当する症例について臨床的にさらにくわしく検索したところ、これらは長期にわたり病態が変化していないと考えられるものであった。

5. 分子量78k画分の精製ならびにアミノ酸組成について

パンピング洗浄によって得られた関節液はSephacryl S-200によるゲル濾過クロマトグラフィー(図1)を用いて分子ふるいにかけた。得られたピーク2に78k画分が含まれることから、この画分をDEAE-Sephacelクロマトグラフィー(図2)にかけ、電気泳動的に検索したところ、78kタンパク質は非吸着成分として得られた(写真4a)。DEAE-Sephacelのピーク2はさらに電気泳動後ゲルから回収して単離した(図4b)。得られた78kタンパク質は加水分解後のアミノ酸分析の結果(表5)からセリン、グリシンが主要構成アミノ酸でその他疎水性アミノ酸としてイソロイシン、ロイシンが多く存

図 1 Sephacryl S-200 によるゲル濾過クロマトグラフィー(画分 2 に 78 k タンパク質が溶出される)

図 2 DEAE-Sephacel イオン交換クロマトグラフィー

G: グラジエント開始
D1: 非吸着画分
D2: 吸着画分

表 5 78 k タンパク質のアミノ酸組成

Asp	20
Glu	24
Ser	101
Gly	213
Ala	14
Pro	14
Val	63
Met	24
Ile	273
Leu	240
Lys	14

1,000

(残基数/1,000残基)

写真 4 a: DEAE-Sephacel イオン交換クロマトグラフィーの画分 2 の電気泳動像
b: 画分 2 の電気泳動ゲルから回収後の像
STA: 標準タンパク質

表 6 78 k タンパク質の出現程度と臨床所見間の相関係数

総タンパク質量	0.49
性	0.17
年 齢	-0.02
雑 音	0.33
開口障害期間	-0.02
顎関節部位疼痛	0.26
発痛点	-0.08
最大開口域	-0.26
局麻後最大開口域	0.43
円板の変化	0.58
関節結節の変化	0.18
下顎頭の変化	0.35

で正の関係として示された。
その他の臨床諸所見では相関係数が認められなかった(表 6)。

考 察

1. 顎関節液の採取ならびに含有成分について

顎関節腔は他の四肢関節と較べて狭小であり、また顎関節症では関節炎における場合と異なり関節腔内に滑液の貯留をみることはほとんどない。したがって、顎関節症では関節腔に挿入した穿刺針から直接に関節液を吸引することは不可能である。このため、本研究では顎関節

在した。
6. 78 k タンパク質と臨床所見間の相関関係
顎関節液に認められた 78 k タンパク質の CBB 染色による定量結果と臨床所見、総タンパク質量間の相関係数を算出した結果、関節円板の変化の相関係数が統計学的に高い正の関係を示す0.50以上から0.70未満にあることが認められた。また含有する総タンパク量や局麻後の最大開口域と 78 k タンパク質ではそれぞれ 0.49, 0.43

液採取の手段として、関節腔内の造影X線撮影検査などに際して行われている関節腔の局所麻酔剤によるパンピング後の回収液に含まれる微量の試量を分析することにした。

近年、顎関節症とくに関節円板前方転位として一括されている症例の顎関節腔内部構成部分の異常に関する病態分類が進み、それに伴って診断手段としての関節腔造影X線撮影が重要な役割をになうようになった⁶⁻¹²⁾。

その際、造影剤の注入に先立ち、挿入した穿刺針を通して局所麻酔液を関節腔内に注入、吸引し、関節内面を麻酔しておくのが通例である³⁰⁾。この関節パンピングは、整形外科領域では関節内の洗浄、薬剤の注入など、治療としての目的でも日常臨床において行われている手段であり¹⁴⁾、顎関節においても顎関節症に随伴した顎顔面疼痛の鑑別³⁰⁾、顎関節内の拡大¹⁵⁾などの目的で行われている。したがって、本法による関節液の採取ならびにその生化学分析が可能になるならば、日常臨床における補助的診断として役立つものと考えられる。

採取した関節液を含むパンピング後の回収液をただちに遠心分離することにより、含有する細胞や不溶成分を除去した。

これまで行われてきた顎関節腔内容物に関する研究としては、大西ら⁶⁾は赤血球、白血球、リンパ球など血球成分と滑膜細胞、膠原線維様構造物、線維芽細胞など結合組織性成分ならびに角化型扁平上皮性細胞が存在していることを示している。また、清水ら²⁹⁾は、このような顎関節腔内の有形成分は顎関節雑音を有する患者においては他の顎関節症患者よりも採取量が多くなる傾向を示すことを報告している。しかしながら、顎関節液の可溶性画分に関する研究としてはカニクイザルを対象とした動物実験による顎関節滑液に含有されるグリコサミノグリカン (GAG) に関する研究⁴²⁾のみである。この研究からは人為的に臼歯部を挙上した実験群で GAG が減少することが報告されているのみで、含有するタンパク質などに関する報告はない。

これに対して整形外科領域においては、とくに膝関節液に関して広く研究され、 α 1-酸性グリコプロテイン、トランスフェリン、セルロプラスミン、 α 2-マクログロブリン、IgG、IgM が疾患時に増加する⁴⁴⁾こと、また加齢とともにヒyaluron酸が減少すること^{45,46)}、さらに酵素、脂質、補体などに関しても以前から研究がなされている⁵⁰⁾。

顎関節液における本研究の結果と諸研究との差異を比較したところ、関節に異常のある場合は血漿由来のタンパク質量の上昇が認められることが多く、特にアルブミンやトランスフェリンの増加は膝関節液同様に顕著であった。

2. 臨床所見と 78 k タンパク質との関係

正常例において 78 k タンパク質は検出されなかった。

CBB 染色による 78 k タンパク質の出現と関節円板の異常との相関係数は統計学的に高い正の関係を示すものであった。

このことは円板の変形、位置異常、関節円板穿孔、関節円板癒着などの形態異常が 78 k タンパク質の出現に深く関与することを示唆している。また、アミノ酸の分析によって本タンパク質が非コラーゲン性のタンパク質であることを示したことから、関節円板の何らかの異常によって周囲の滑膜が影響をうけ、この部分から出現したか、あるいは関節円板中のコラーゲンを取り巻く基質部分に由来するものと考えられた。また関節液総タンパク質量、局麻後の最大開口域と 78 k タンパク質との相関係数がそれぞれ 0.49、0.43 を示し、統計学的に正の関係があることが認められた。一方、雑音、開口障害期間、顎関節疼痛、最大開口域、関節結節の変化、下顎頭の変化と 78 k タンパク質とは相関関係が示されなかったことから、これらの諸症状は直接的に同タンパク質の出現に関与するものではないことが示唆された。

3. 生化学的分析による顎関節液タンパク質の特徴

これまで膝関節などにおける関節液中のタンパク質成分の検索は関節液の採取方法の容易さもあって、比較的報告は多い⁴⁷⁻⁴⁹⁾。これらによると、一般的には、ムコ多糖を主体とする滑液成分に滑膜を通過した血漿成分が加わったものと考えられている⁵⁰⁾。この点、顎関節液の成分においては、正常例でアルブミンがわずかに存在することが示された。しかし、疾患例においては免疫電気泳動や SDS 電気泳動の結果からの A/G 比が 2.26 であったことから、関節液が血漿成分に近いことが示された。このことは、関節腔内への血漿成分の透過が起きていることを示唆している。造影X線撮影によって円板の変形がみられる症例に対して行った関節鏡検査時に、円板後部滑膜の直下に多くの毛細血管が増生している所見が得られることから、疾患時には関節腔内への血漿成分の透過が多くなることを示していると考えられる。また、総タンパク質量も正常の6倍に相当するもので、このような疾患によるタンパク質の増加傾向は膝関節諸疾患における場合²⁶⁾と類似していた。さらに、顎関節腔内には血漿由来とは考えにくいタンパク質の存在も認められた。すなわち、分子量10万以上の画分はコラーゲン性タンパク質であった。これまでの整形外科領域における関節疾患の生化学的研究から、諸疾患例において滑膜由来の成分や周囲組織由来のタンパク質が合成分泌あるいは組織破壊などにより検出されると報告されている⁵¹⁾。関節の主要タンパク質であるコラーゲンにおいて、羽生ら⁵²⁾は関節液に分泌されたコラーゲン糖化合物の割合が疾患とのかかわり合いを有することを述べている。すなわち、疾患例ではコラーゲン中のヒドロキシリシンがかわる糖化合物の割合が多くなることを報告している。この点、関節円板においても、その主要成分がコラーゲ

ンであり、可溶性のコラーゲンはほとんど存在せず、不溶性のコラーゲンが多く、特にヒドロキシリシンに関連した糖化合物の割合が多いことが鹿島⁴³⁾によって報告されている。

したがって、関節円板の変形に伴う線維組織の破壊によって関節液中に遊離した不溶性コラーゲン由来成分も存在するものと思われる。これらの既知のタンパク質とは別に、顎関節液中には血漿由来ともコラーゲン由来とも考えられないタンパク質が疾患例中 78k タンパク質として認められた。本タンパク質は正常例では認められず、顎関節症例すべてに銀染色で認められるものであるが、CBB 染色からは疾患の程度によってその存在量が異なることが示された。この 78k タンパク質は貯溜したタンパク質量には関係なく、78k タンパク質が多くても貯溜タンパク質の量が多くなることはない。また疾患例における A/G 比から血漿成分が多いからといって、このタンパク質の存在量もまた多く含有することはない。このような 78k タンパク質はアミノ酸組成から、セリン、グリシンが主要構成アミノ酸で、その他疎水性アミノ酸としてのイソロイシンやロイシンが多く存在し、塩基性アミノ酸の割合は少なく、プロリンや、ヒドロキシプロリン、ヒドロキシリシンといったコラーゲン性のアミノ酸はなく、コラーゲン性のタンパク質ではないことから、病理の状態において滑膜によって合成分泌されたものか、あるいは物理的ないしは酵素的に関節を構成する組織が分解され、生じたタンパク質であろうことが推察されたが、より詳細な点については今後の課題となる。

結 論

本研究から顎関節症の臨床的諸診断と関節液含有タンパク質の分析から次のような結論を得た。

1. 正常顎関節液の総タンパク質量は平均 205 $\mu\text{g/ml}$ で、疾患例においては 1,259 $\mu\text{g/ml}$ で正常例に比べ約 6 倍のタンパク質量を有していた。
2. 顎関節液中のタンパクの主要構成成分は免疫電気泳動によって検索した結果、正常例ではアルブミンであったが、疾患例ではアルブミンのほかトランスフェリンや IgG が主要な血漿由来のタンパク質として存在していた。

また、SDS 電気泳動上の A/G 比は疾患例では 2.26 で、血漿の A/G 比に近い値であることから血漿成分の透過が示唆された。

3. 臨床的諸診断から得た上関節腔における器質的变化は著明 53.3%、中等度 20%、なし 26.7% であった。また、疾患例で認められた分子量約 78k のタンパク質は、CBB 染色でタンパク質総量の 1% 以上存在するもので、著明あるいは中等度に相当するものは 57% であ

た。78k タンパク質が 1% 以下で著明あるいは中等度に相当するものは 16% 存在し、なしのものは 27% であった。この結果、本タンパク質が 1% 以下で著明あるいは中等度に相当する症例について精査した結果、長期にわたる疾患あるいは病変が安定しているものに相当し、本タンパク質は上関節腔に器質的变化がある時、出現する傾向があり、疾患時における活動性を知る一つの手がかりになることが示唆された。

4. 78k タンパク質のアミノ酸分析から、セリン、グリシンが主要構成アミノ酸で、またイソロイシン、ロイシンが多く存在し、非コラーゲン性のタンパク質であることが示された。

5. 78k タンパク質の出現と臨床所見、総タンパク質量との相関係数を求めた結果、関節円板の変化との相関係数が 0.58 で統計学的に高い正の関係を示した。

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、終始懇切丁寧なご指導とご校閲をいただきました歯学部生化学教室高木亨講師、当教室木野孔司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生化学教室、歯学部附属病院検査部ならびに当教室の諸先生方に厚くお礼申し上げます。

なお、本論文の一部は 1986 年 10 月 17 日第 31 回日本口腔外科学会総会、1987 年 5 月 2 日第 28 回大韓口腔顎顔面外科学会総会（於韓国、ソウル）、1987 年 11 月 20 日第 32 回日本口腔外科学会総会、1988 年 4 月 6 日第 29 回大韓口腔顎顔面外科学会総会、1988 年 10 月 9 日第 30 回歯科基礎医学会総会において発表した。

引 用 文 献

- 1) 上野 正：顎関節疾患の X 線診断。臨床放射線 2: 381-388 1957.
- 2) 上野 正：顎関節疾患に関する研究。日本歯科医師会誌 7: 7-14 1959.
- 3) 高久 遼：正常ならびに病的顎関節の X 線学的研究。口外誌 7: 1-17 1961.
- 4) Farrar, W.B.: Diagnosis and treatment of anterior dislocation of the articular disc. New York J Dent 41: 348-351 1971.
- 5) Farrar, W.B. and McCarty, W.L.: Inferior joint space arthrography and characteristics of condylar paths in internal derangements of the TMJ. J Prost Dent 41: 548-555 1979.
- 6) 大西正俊：顎関節内穿刺とその応用に関する臨床的研究。口病誌 37: 178-207 1970.
- 7) Westesson, P.-L.: Double-contrast arthrography and internal derangement of the temporomandibular joint. Swed Dent J [Suppl] 13

- 1982.
- 8) Wilkes, C.H.: Arthrography of the temporomandibular joint in the patients with the TMJ pain-dysfunction syndrome. *Minn Med* 61: 645-652 1978.
- 9) Katzberg, R.W., Dolwick, M.F., et al.: Arthrotomography of the temporomandibular joints: New technique and preliminary observations. *Am J Roentgenol* 132: 949-955 1979.
- 10) Dolwick, M.F., Katzberg, R.W., et al.: Arthrographic evaluation of the temporomandibular joint. *J Oral Surg* 37: 793-799 1979.
- 11) Nøgaard, F.: Arthrography of the mandibular joint. *Acta Radiologica* 25: 679-685 1944.
- 12) Jacobsen, H.K.: On the normal arthrogram of the mandibular joint. *Acta Radiologica* 27: 93-97 1946.
- 13) 渡辺正毅: 関節鏡の現状と将来. *外科治療* 26: 72-77 1972.
- 14) 高木憲次: 関節鏡. *日整会誌* 14: 359-384 1939.
- 15) 大西正俊: 顎関節の関節鏡的検査法. *口病誌* 42: 207-213 1975.
- 16) 木野孔司: 顎関節上関節腔の内視鏡所見に関連する滑膜ならびに滑膜ヒダの形態と構造についての観察. *口病誌* 47: 98-134 1980.
- 17) 真野 勇: NMR 診断法. 第1版, 秀潤社, 東京, 1984, 27-64頁.
- 18) 鄭 勲, 木野孔司, 他: 顎関節におけるN.M.R. 映像法 (MRI) の応用について. *日本歯科評論* 521: 257-261 1986.
- 19) Lauterbur, P.C.: Image formation by induced local interactions: examples employing nuclear magnetic resonance. *Nature* 242: 190-191 1973.
- 20) Helms, C.A., Richardson, M.L., et al.: Nuclear magnetic resonance imaging of the temporomandibular joint. Preliminary observations. *J Craniomandib Pract* 2: 220-224 1984.
- 21) Harms, S.W., Wilk, R.M., et al.: The temporomandibular joint: Magnetic resonance imaging using surface coil. *Radiology* 157: 133-136 1985.
- 22) Katzberg, R.W., Bessette, R.M., et al.: Normal and abnormal temporomandibular joint, MR imaging with surface coil. *Radiology* 158: 183-189 1986.
- 23) Donlon, W.C. and Moon, K.L.: Comparison of magnetic resonance imaging, arthrotomography and clinical and surgical finding in temporomandibular joint internal derangement. *J Oral Surg* 64: 2-5 1987.
- 24) Wilk, R.M., Harms, S.E., et al.: Magnetic resonance imaging of the temporomandibular joint using a surface coil. *J Oral Maxillofac Surg* 44: 935-943 1986.
- 25) 坂本庸人: 病的関節液の細胞組織化学的研究. *日整会誌* 43: 123-134 1969.
- 26) 林 泰史: 関節液の組成. *整形外科 MOOK* 32: 1-8 1984.
- 27) 阿部正隆: 検査資料としての関節液. *整形外科 MOOK* 32: 71-77 1984.
- 28) 立石博臣: 関節液の液性成分と細胞検査. *臨床検査 MOOK* 20: 178-186 1985.
- 29) 清水正嗣: 顎関節腔内容液の細胞学的検索. *口病誌* 37: 245 1970.
- 30) 木野孔司, 和気裕之, 他: 顎関節症疼痛に対する関節腔内パンピングによる鑑別法. *日口外誌* 33: 1450-1457 1987.
- 31) 日本生化学会編: 生化学実験講座 I タンパク質の科学. 第1版, 東京科学同人, 東京, 1976, 45-55頁.
- 32) 大谷秀樹, 河合 忠: 免疫電気泳動法. 第1版, 医学書院, 東京, 1973, 4-11頁.
- 33) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685 1970.
- 34) Weber, K. and Osborn, M.: The reliability of molecular weight determinations by Dodecyl Sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* 244: 4406-4412 1969.
- 35) Wray, W., Bouliskas, T., et al.: Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 118: 197-203 1981.
- 36) Posner, I.: A new apparatus for the recovery of macromolecules from polyacrylamide gel slabs following preparative vertical gel electrophoresis. *Anal Biochem* 72: 491-501 1976.
- 37) Tuszynski, G.L., Damsky, C.H., et al.: Recovery of concentrated protein samples from Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 83: 119-129 1977.
- 38) Hanaoka, F., Shaw, J.L., et al.: Recovery of functional proteins from sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 99: 170-174 1974.
- 39) Towbin, H., Staehelin, T., et al.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354 1979.
- 40) 古川俊之, 田中 博: 多変量解析プログラムパッケージ入門. 第1版, 医学書院, 東京, 1983, 1-15頁.
- 41) フロイント, J.E., ウィリアムス, F.J.: 統計学入門下. 第1版, 培風館, 東京, 1974, 125-141頁.
- 42) 荒木春美, 覚道健治, 他: 両側臼歯部欠損が顎関節滑液のグリコサミノグリカンにおよぼす影響に関する研究 (抄). 第1回日本顎関節学会誌: 81 1988.

- 43) 鹿島健司：顎関節円板構成コラーゲンの生化学的分析. 日口外誌 34: 424-437 1988.
- 44) Kushner, I. and Somerville, J.A.: Permeability of human synovial membrane to plasma proteins. *Arthritis Rheum* 14: 560-570 1971.
- 45) Sundblad, L.: Studies on hyaluronic acid in synovial fluid. *Acta soc Med Upsalien* 58: 113-115 1953.
- 46) Bollet, A.J.: The intrinsic viscosity of synovial fluid hyaluronic acid. *J Lab Clin Med* 48: 721-728 1956.
- 47) Ward., P.C.J.: Interpretation of synovial fluid data. *Postgraduate Med* 68: 175-184 1980.
- 48) Sandson, J.: Human synovial fluid: Detection of a new component. *Science* 155: 839-841 1967.
- 49) Jacox, R.F. and Feldmahn, K.: Variation of β -glucuronidase concentration in abnormal human synovial Fluid. *J Clin Invest* 34: 263-267 1955.
- 50) 岩田 久：関節炎モデル動物. 第1版, 医歯薬出版, 東京, 1985, 19-25頁.
- 51) 岩田 久：関節症と軟骨マトリックス変形性関節症病態との関連から. 整形・災害外科 23: 161-165 1980.
- 52) 羽生忠正：ヒト関節液中のコラーゲンに関する研究. 新潟医学会雑誌 95: 377-390 1981.
-