両側臼歯欠損が顎関節滑液のグリコサミノグリカンに及ぼす 影響についての生化学的研究

荒木 春 美

Effect of bilateral extraction of molars on glycosaminoglycans in the synovial fluid of the temporomandibular joint in monkeys

Harumi ARAKI

Abstract: This study was designed to determine the effect of bilateral extraction of all molars and premolars on glycosaminoglycans (GAG) in the synovial fluid of the monkey temporomandibular joint (TMJ). TMJ radiographs were taken using standard techniques at intervals of 2, 4, 8, 16, and 24 weeks following surgery. The synovial fluid was digested with pronase E and GAG were extracted using CPC at intervals of 2, 8, 16, and 24 weeks following surgery. Qualitative and quantitative changes in the GAG were examined by the carbazole reaction and electrophoresis on a cellulose acetate strip. The molecular weight distribution of GAG was examined by gel chromatography.

The following results were obtained

1) No morphological changes were observed in the condylar head or articular eminence, although the position of the condyle changed in a superoposterior direction in the 16 and 24 week groups.

2) The GAG was composed of hyaluronic acid (HA) only.

3) HA concentration as uronic acid was initially 2.13 mg/ml, gradually decreasing with time.

4) Gel chromatography-measured HA in the experimental groups was eluted later than the control group, indicating a decrease in the molecular size of HA in the experimental groups. Decreased molecular size of HA was observed up until the 16 week; an increase to the 2 week level was observed in the 24 week group.

It is suggested that bilateral extraction of molars in monkeys caused quantitative and qualitative changes in the HA of the synovial fluid.

Key words: synovial fluid (滑液), temporomandibular joint (顎関節), occlusal alteration (咬合異常)

結 言

近年、顎関節部疼痛や雑音を主症状とする顎関節症の

大阪歯科大学口腔外科学教室第1講座

(主任：白数力也教授)

First Department of Oral and Maxillofacial
Surgery, Osaka Dental University (Chief: Prof.
Rikiya Shirasu)

受付日：昭和63年12月20日

患者は増加する傾向にあり、それについての臨床的、あるいは実験的報告が数多く集積されてきている。なかでも、顎関節に及ぼす咬合異常の影響については、組織学的¹⁻⁴⁾および超微構造的^{5,6)}な検索がいくつか行われているが、滑液に及ぼす影響については、わずかに森本⁷⁾が片側咬合挙上時の顎関節滑液を対象にヒアルロン酸(以下、HAと略す)の量的変動について報告した知見があるにすぎない。そこでわたくしは、顎関節滑液の性状ならびに咬合異常に伴う質的、量的変動を明らかにするため、サル顎関節を用いて、正常滑液のグリコサミノグリ

写真 1 サル用顎関節規格エックス線撮影装置と撮影時の状態

カン（以下、GAG と略す）の組成を検索し、さらに両側臼歯欠損に起因する咬合異常時の顎関節滑液 GAG の分子種レベルの動態を酵素消化法、電気泳動法の併用で生化学的に分析し、その分子量分布の変動をゲル濾過法による溶出パターンから解析した。

実験材料および方法

1. 実験材料

実験には歯牙年齢 M_2/M_2 の雌性 *Macaca fascicularis* 20 頭（体重 1.72～3.20 kg）を用いた。実験期間中、サル用固型飼料（オリエンタル酵母、東京）および生甘藷を用いて実験動物を同一条件下で飼育した。実験動物を 1 群 4 頭として 5 群にわけ、両側上顎 P_1 , P_2 , M_1 および M_2 を抜歯後、両側下顎 P_1 , P_2 , M_1 および M_2 の歯冠を歯頸部まで削合し、術後 2, 8, 16 および 24 週経過したものをそれぞれ実験群とした。また未処置のものを対照群とした。

2. 実験方法

1) 肉眼的観察

実験群の各群 4 頭は、術前と術後 2～24 週の経過時に、肉眼による口腔内所見の観察を行った。

2) 顎関節規格エックス線の分析

(1) 撮影法

下顎頭と下顎窩の形態的变化および下顎頭の位置的变化をエックス線的に観察するために、実験群および対照群の各 1 頭を、術前、術後 2～24 週の経過時に荒木ら⁹⁾の考案したサル用顎関節規格エックス線写真撮影装置を

写真 2 上顎関節滑液採取法

用いてエックス線写真撮影を行った（写真 1）。

(2) エックス線写真分析法

撮影したエックス線写真は、万能投影機（Nikon Profile Projection Model V-16）を用いて 5 倍に拡大した像をトレースし、外耳孔、下顎窩を基準として重ね合わせを行い術前と術後の各経過時における下顎頭と下顎窩の形態的变化および下顎頭の位置的变化を観察した。

3) 顎関節滑液の生化学的分析

(1) 試料採取法

実験群および対照群の各群 4 頭は、ペントバルビタールによる全身麻酔下で断頭し、森本の方法⁷⁾に準じて上下顎関節滑液を採取した（写真 2）。採取した試料は測定時まで -30°C で凍結保存した。

(2) GAG の抽出法

実験群および対照群の上下顎関節滑液は 0.1 M リン酸緩衝液（pH 7.8）中、ブローナーゼ（科研製薬、東京）で 37°C 、24 時間消化した。未消化物を遠心（3,000 rpm, 10 分間）除去後、その上清に終濃度が 0.03～0.04 M となるように塩化ナトリウムを加えた。さらにセチルピリジニウムクロライドを白濁が生じなくなるまで加え、 4°C 、24 時間放置し、沈渣を遠心（3,000 rpm, 20 分間）後、回収して蒸留水に溶解し、さらに 5 倍量（v/v）の 1% 酢酸カリウム-エタノール溶液を加えて 4°C 、5 時間放置した。遠心（3,000 rpm, 20 分間）後、回収して得た沈渣を、1% 酢酸カリウム-エタノール溶液で 3 回洗浄したのち、蒸留水に溶解後凍結乾燥して GAG 試料とした（図 1）。

(3) セルロース・アセテート膜電気泳動法

対照群の上下顎関節滑液より抽出精製した GAG の同定には、セルロース・アセテート膜二次元電気泳動⁹⁾を、GAG 特異分解酵素による消化後の GAG 分子種の確認と実験群の上下顎関節滑液より抽出精製した GAG の同定には、セルロース・アセテート膜一次元電気泳動を行った。一次元電気泳動では SM 11200（Sartorius, Germany）を支持体とし、0.2 M 酢酸カルシウム溶液で、1 mA/cm, 3 時間泳動した。二次元電気泳動では

図 1 顎関節液 GAG の抽出法

表 1 酵素消化の条件

酵 素	緩衝液	pH	消化温度 (°C)	消化時間 (時間)	酵素濃度
ハトレプトミセス ヒアルロニダーゼ	0.05 M 酢酸	5.0	50	24	100 T.R.U./ml
コンドロイチナーゼ ABC	0.1 M トリス塩酸	8.0	37	24	5 units/ml

セバラックス (常光産業, 東京) を支持体とし, 一次展開は 0.1 M ビリジン-0.47 M キ酸緩衝液 (pH 3.0) で 1 mA/cm, 1 時間, 二次展開は 0.1 M 酢酸バリウム溶液 (pH 8.0) で 1 mA/cm, 3 時間泳動した。泳動後のアセテート膜は, 0.1% アルシアンブルー 8 GS の 3% 酢酸溶液で 20 分間染色後, 1% 酢酸溶液で数回脱色し, 流水でよく水洗した。標準にはヒアルロン酸 (Sigma, USA), コンドロイチン硫酸 A および C, デルマタン硫酸, ヘパラン硫酸およびヘパリン (以上, 生化学工業, 東京) の 6 種類の GAG を用いた。

(4) 酵素消化法

対照群の上下顎関節液より抽出精製した GAG は, ストレプトミセスヒアルロニダーゼ¹⁰⁾およびコンドロイチナーゼ ABC¹¹⁾による酵素消化試験を行った。前者は 0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 中で, 50°C, 24 時間, 後者は 0.1 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) 中で, 37°C, 24 時間それぞれ反応させた (表 1)。

(5) GAG の定量法

実験群および対照群の上顎関節液より抽出精製した GAG の濃度は, Bitter-Muir 法¹²⁾によるウロン酸定量

値から求めた。

(6) Sepharose CL 2B ゲル濾過法

実験群および対照群とも上下顎関節液より抽出精製した GAG は Sepharose CL 2B ゲル濾過法で分画した。GAG を 0.5 M 酢酸緩衝液 (pH 6.8) に溶解し, 同緩衝液で平衡化した Sepharose CL 2B カラム (0.9 × 60 cm) に注入した。溶出は同緩衝液 (流速 3.2 ml/時間) で行い, 0.8 ml ずつ画分を回収しウロン酸量を測定した。試料量が微量のためウロン酸量の測定には次に述べるように蛍光修飾法と高速液体クロマトグラフィー (以下, HPLC と略す) を併用¹³⁾した。各画分は PD-10 カラムで脱塩後, 0.05 M 塩酸中で 110°C, 16 時間加水分解した。冷却後, 蒸発乾固したものに, 内標準として 0.01% ガラクツロン酸 100 μ l を加え, さらに 50% トリエチルアミン-エタノール溶液 100 μ l を加えて 40°C, 45 分間反応後凍結乾燥した。凍結乾燥試料は 10 μ l の蒸留水に溶解後, 蛍光修飾のために 1% ダンシルヒドラジン-エタノール溶液 20 μ l と 0.75% トリクロル酢酸-エタノール溶液 20 μ l を加え, 40°C, 60 分間反応させた。その後室温に冷却し, 反応液の一部を分析試料として

写真 3 口腔内写真

a : 術後2週 b : 術後24週

写真 4 術前の顎関節規格エックス線写真

a : 左側 b : 右側

HPLC に $1 \sim 20 \mu\text{l}$ 注入した。装置は日立 650-60 形分
光蛍光光度計付き高速液体クロマトグラフ (日立 638-50
形) で、カラムは TSK-gel NH_2 -60 ($4.6 \text{ mm i.d.} \times 250$
 mm)、溶離液はアセトニトリル- 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH
 5.6 , $5/1 : \text{v/v}$) を用い、流速は 1.0 ml/分 とした。

実験結果

1. 肉眼的観察

実験群では術後2週で抜歯窩は治癒し、16～24週で上
下顎臼歯歯槽部は接しており、対照群に比べ咬合高径の
低下を認めた (写真 3 a, b)。

2. 顎関節規格エックス線像の分析

撮影した規格エックス線写真上では、実験群および対
照群の下顎頭および下顎窩に経日的な形態的变化は認め
られなかった (写真 4 a, b, 5 a, b)。

実験群の各群と対照群のエックス線像をトレースした
ものを重ね合わせて比較したところ、鼻聴道線を基準と
して実験群の下顎頭は左右両側とも術後16～24週で後上
方方向へ偏位した (図 2 a, b)。

3. 顎関節滑液の生化学的分析

1) 顎関節滑液中の GAG の組成

対照群顎関節滑液 GAG の二次元電気泳動像では、
標準の HA に相当する位置に明瞭なスポットが認めら
れたのみで、他の標準に相当する位置にスポットは認め
られず (図 3), GAG 特異分解酵素による酵素消化後
の一次元電気泳動像でも、HA に相当するスポットは消
失し、新たなスポットの出現も認められなかった (図 4)。
また、実験群各群の顎関節滑液 GAG の一次元電気泳動
像では、いずれも HA に相当するスポットのみで他の
スポットは認められなかった (図 5)。

2) 顎関節滑液中の GAG 濃度の変動

顎関節滑液 GAG 濃度をウロン酸量を指標として示す
と、対照群では 2.13 mg/ml , 実験群では 2 週群で 1.62
 mg/ml , 8 週群で 1.51 mg/ml , 16 週群で 1.18 mg/ml ,
および 24 週群で 1.12 mg/ml のウロン酸が含まれてい
た (表 2)。

実験群では術後2～24週にかけて経日的に GAG 濃度
は低下傾向を示した。すなわち、2 および 8 週群では対
照群に比べ有意 ($p < 0.05$, $p < 0.05$) に低値を示し、ま

写真 5 術後24週の顎関節規格エックス線写真
a : 左側 b : 右側

図 2 術前と術後24週に撮影したエックス線
像をトレースしたものの重ね合わせ
a : 左側 b : 右側

図 3 対照群顎関節滑液 GAG の二次元電気泳動図
標準: 1. コンドロイチン硫酸A, 2. デルマトン硫酸, 3. ヒアルロン酸, 4. ヘパリン硫酸

図 4 対照群顎関節滑液 GAG の一次元電気泳動図
標準: 1. コンドロイチン硫酸C
コンドロイチン硫酸A
デルマトン硫酸
ヒアルロン酸
2. ヘパリン
ヘパリン硫酸
TMJ: 顎関節滑液
SH: ストレプトミセスヒアルロニダーゼ
CH: コンドロイチナーゼ ABC

図 5 実験群顎関節滑液 GAG の一次元電気泳動図

a : 上関節腔滑液 b : 下関節腔滑液
標準 : 1. コンドロイチン硫酸C
 コンドロイチン硫酸A
 デルマタン硫酸
 ヒアルロン酸
2. ヘパリン
 ヘパラン硫酸

た16および24週群でも、対照群に比べ有意 ($p<0.01$, $p<0.01$) に低値を示した。さらに、8週群では2週群に比べ、有意差は認められないものの、低下する傾向が認められ、16週群は8週群に比べ、有意 ($p<0.05$) に低下し、24週群は16週群に比べほとんど変化は認められなかった (図6)。

3) 顎関節滑液中の GAG の分子量分布

顎関節滑液 GAG 加水分解物の HPLC のクロマトグラムでは、ウロン酸異性体として内標準であるガラクトロン酸とグルクロン酸のピークが認められたのみでイズロン酸のピークは認められなかった (図7)。すなわち、電気泳動で得られた結果と同様に、GAG として回収した試料中には HA のみが含まれ、デルマタン硫酸やヘパラン硫酸は存在しないことが示された。これを基に、グルクロン酸のピーク高さを HA のゲル濾過によるクロマトグラムの指標とした。

実験群および対照群の顎関節滑液 GAG のゲル濾過のクロマトグラムは、ガラクトロン酸 (内標準) に対するグルクロン酸のピーク高さの比から求めた。

各クロマトグラムを検討すると (図8)、対照群では、シャープな立ち上がりの比較的幅のせまいピークであるのに対し2週群では、ピークの位置が低分子方向に偏位し、ややなだらかなクロマトグラムとなった。8週群では、さらにピークがやや低分子方向に偏位した。16週群ではピークの位置は8週群と比べさらに低分子方向に偏位し、なだらかな幅広いピークとなった。このように対照群から16週群までは、ピークの溶出位置は遅くなり、HA の分子量分布は低分子方向への移動傾向を示した。しかし、24週群ではピークの溶出位置は16週群と比べ早くなり、2週群の溶出位置に近づくことから、HA の分子量は低分子化から回復する傾向が認められた。

考 察

顎関節症の病因については諸説があるが、不良補綴物による咬頭干渉や早期接触、あるいは臼歯欠損などの咬合異常は重要な因子として考えられている。そのため、咬合異常が顎関節に及ぼす影響については臨床的あるいは

表 2 実験群および対照群の顎関節滑液 GAG 中のウロン酸量 (単位: mg/ml)

サル個体No.	1	2	3	4	mean $\pm$ S.E.
対照群	2.50	2.19	2.19	1.65	2.13 $\pm$ 0.154
2週群	1.37	1.59	1.88	1.64	1.62 $\pm$ 0.090
8週群	1.37	1.56	1.46	1.65	1.51 $\pm$ 0.051
16週群	0.90	1.36	1.15	1.31	1.18 $\pm$ 0.089
24週群	0.92	1.29	1.24	1.02	1.12 $\pm$ 0.076

図 6 実験群および対照群の顎関節滑液 GAG 濃度の推移

は実験的に数多くの研究がなされてきた^{1-7, 14-19)}。関¹⁷⁾は、顎関節症患者の 2/3 に静的咬合関係の異常がみられたと述べ、鬼塚¹⁸⁾は、顎関節症に関する臨床的研究で、顎関節症の 7 割以上が咬合異常に起因すると述べている。また、実験的には、山崎¹⁾および Kubo⁶⁾ が片側咬合挙上による咬合異常について、Avant¹⁴⁾、Cimasoni¹⁵⁾、Furstman¹⁶⁾、喜久田²⁾、樋田³⁾ および Ueno⁵⁾ が歯の欠損による咬合異常についてそれぞれ検索し、顎関節に組織学的あるいは超微構造的変化の生じることを報告している。一方、関節の潤滑に関与している滑液は、森本⁷⁾ が片側咬合挙上時における顎関節滑液 HA の生化学的検討を行い、挙上側顎関節滑液 HA の早期減少と、6 週以後の回復を報告している研究があるのみである。

HA は、Meyer²⁰⁾ によってウシ硝子体より単離命名された GAG であり、滑液の主要構成成分である。生体内での HA の生理的機能としては、蛋白と結合して細胞間で結合水を取り、ゼリー状のマトリックスを形成して細胞を保持し滑剤として働くとともに、細胞間物質の移動の制御、外力やバクテリアの侵襲に対する保護、創傷治癒作用、リンパ球の幼若化抑制作用、白血球の食作用抑制などがあげられており²¹⁾、HA は関節が正常な機能を営むために重要な成分であると考えられる。

そこで、歯の喪失によって引き起こされた咬合異常時の顎関節滑液中の HA の動態を知るために、森本の研究をさらに進めて、本実験では滑液中 GAG の同定とそ

図 7 対照群顎関節滑液 GAG 加水分解物の HPLC クロマトグラム
1. グルクロン酸 2. ガラクツロン酸

図 8 実験群および対照群の顎関節滑液 GAG の Sepharose CL2B クロマトグラム

の量的変動, さらに分子量分布を検討した。

その結果, 顎関節滑液中の GAG には, 実験群, 対照群ともに HA のみが検出され, 他の GAG は認められなかった。吉良²²⁾は, 正常膝関節滑液では同定できなかったコンドロイチン硫酸 (以下, CS と略す) が膝関節リウマチの患者に限り存在し, HA/CS 比は重症化に伴って低下する傾向があると述べている。また, 桑野²³⁾も種々の膝関節疾患の滑液には HA 以外に CS が存在したと述べている。このように滑液中の CS の出現は, 関節疾患と関連性があると示唆されており, その由来については軟骨からの分解産物²⁴⁾, あるいは滑膜細胞における合成の結果である²⁵⁾などの見解があり, その詳細は不明である。しかし, 本実験では CS は同定されなかった。これは, 本実験が顎関節構成体に強い炎症を起こさない程度の両側臼歯欠損という比較的ゆるやかな実験条件であったことに起因するのかもしれない。

Hatton ら²⁶⁾は, ウシ顎関節滑液中のウロン酸濃度を Bitter-Muir 法で測定し, 得られた値を定数 (2.06) 倍して HA 濃度を算出し, 上関節腔では $1.94 \pm 1.31 \text{ mg/ml}$, 下関節腔では $2.06 \pm 0.83 \text{ mg/ml}$ であると報告している。また, 森本⁷⁾は, カニクイザル顎関節滑液中の HA 濃度を細管式等速電気泳動装置で測定し, 3.97 mg/ml であると述べている。本実験では, カニクイザル顎関節滑液中の GAG は HA のみから構成されていたので, ウロン酸値から HA 濃度を算出した。その結果, 対照群では 4.39 mg/ml , 2 週群では 3.34 mg/ml , 8 週群では 3.11 mg/ml , 16 週群では 2.43 mg/ml , 24 週群では 2.30 mg/ml であり, HA の濃度は, 術後 2 週から 16 週までは漸減し, 以後はほとんど変化せずに推移した。対照群の HA 濃度 4.39 mg/ml を他の研究結果と比較すると, 細管式等速電気泳動装置で測定したカニクイザル顎関節滑液中の濃度とはほぼ同じ値であるが, ウシ顎関節滑液中の濃度よりやや高値となっている。この理由としては, Hatton らの実験で使用したウシが成牛であるのに対し, 本実験で使用したカニクイザルが若猿であるという実験動物の年齢差による要因と, ウシは切歯群と臼歯群の間にかかなり広い歯隙を有していることや, ウシの関節円板には線維軟骨が存在している²⁷⁾ことから咬合様式がサルと異なっているという動物種による要因があげられる。しかし, 実験動物の滑液中の GAG 濃度の加齢変化や咬合様式について検索した報告はほとんど認められないので今後の検討が必要である。

ところで, HA の前駆物質であるグルコサミン-6-³H は滑膜細胞のゴルジ装置に取り込まれること²⁸⁾, またヒト正常膝関節滑膜培養液中にも HA が存在すること²⁹⁾が確認されていることから, 滑液中に分泌される HA は一般的に滑膜細胞で合成されると考えられている。そのため, 顎関節構成体に何らかの異常が生ずれば HA の合成, 分泌系に障害の起こることは十分推測される。

樋田³⁾は, 両側臼歯欠損のサル顎関節について下顎頭, 関節後突起の骨吸収と骨添加を病理組織学的に経日的に観察し, 骨変化は術後早期にはじまり, 120~180 日後には停止すると述べている。またこの知見から, 下顎は両側下顎臼歯欠損により遠心移動をしたのではないかと推察している。本実験でも, HA 濃度の低下は実験初期にはじまり, 以後術後 16 週まで続くという結果を得ており, 樋田の病理組織学的所見を滑液の生化学的分析値からも裏づける結果となった。HA 濃度の低下の原因としては, 滑膜の透過性亢進による浸出液増加のための希釈効果や, 滑膜細胞の機能障害が考えられる。本実験群では各群の滑液量に変化が認められなかったことから, HA 濃度の低下は主として後者の理由によると思われるが, 採取滑液量が非常に微量であることから前者の理由も否定できない。

顎関節滑液の HA の分子量分布は術後 16 週まで低分子化傾向を示した。一般に病的滑液中で HA 濃度が低下し, 低分子化が起こることについては数多くの報告^{30~33)}がある。低分子化の原因としては滑膜細胞での重合障害や GAG 分解酵素活性の亢進が考えられる。GAG 分解酵素の由来について, 浅井³⁴⁾は血清中および滑液中のヒアルロニダーゼ活性を測定し, 後者が前者を越えることがないことから, 滑液中のヒアルロニダーゼは血清に由来するものであり, 滑膜の透過性の変化によって関節腔内に浸出するのではないかと結論づけた。蛋白質レベルの高分子物質の滑膜における透過性制御機構について, Kakudo³⁵⁾は滑膜の毛細血管の選択的透過性ととも滑膜 A 型細胞のもつ高分子物質取り込み能がその制御機構に強く関与していることを電顕細胞化学的に明らかにしている。さらに Ueno³⁾はラット臼歯抜歯後の顎関節滑膜の変化を電顕的に観察し, 滑膜 A 型細胞に変性が起こり, 変性の程度に応じて経静脈的に投与した horseradish peroxidase の取り込みが漸次減少し, 変性は術後 16 週まで続くと述べている。この電顕所見は, 本実験での HA の低分子化の時期と一致している。これらの所見を考えた場合とすると, GAG 分解酵素活性の亢進の機序については, 抜歯に伴う咬合変化により滑膜 A 型細胞に変性が生じ, ライソゾーム酵素の一つである GAG 分解酵素が細胞外に放出されるとともに, A 型細胞による滑膜透過制御機構が破綻し血清中の GAG 分解酵素が浸出することによるものと考えられる。

顎関節の左右側および上下関節腔による差異についても報告されている。左右顎関節に同条件を付与した Furstman¹⁶⁾は両側間に組織学的に明らかな変化を認めていない。また, 上関節腔滑液と下関節腔滑液の差については, 有意差のないことを森本⁷⁾が報告している。本実験では Furstman と同様に左右顎関節に同条件を付与しているため, 両側顎関節滑液を合わせて実験試料とした。

顎関節症患者の下顎窩と下顎頭の形態的变化および下顎頭の位置的变化についての報告³⁶⁻⁴³⁾は多く、上村ら⁴⁰⁾は、顎関節症患者の顎関節規格エックス線写真を分析し、対象とした601例中295例(49.1%)に異常が認められ、年齢別では40歳以上の症例に形態異常の出現率が高いと述べている。本実験では、形態的变化は認められなかったが、これは実験動物が歯牙年齢 M_2/M_2 と若齢であることや、最長実験期間が24週であるため骨変化が生ずるに至らなかったためであろう。

また、山内ら³⁵⁾はエックス線写真像から、顎関節症患者は下顎頭位の前後的偏位が著明であると述べ、Weinberg⁴²⁾は138名の顎関節症患者のエックス線写真分析から、下顎頭偏位は約90%に認められたと述べている。これらはいずれも正常者と顎関節症患者の比較で、同一個体の経目的な変化を観察したものではない。本実験の顎関節規格エックス線写真による分析では、鼻聴道線を基準として同一個体に術後16~24週で後上方方向への下顎頭の偏位がみられた。この理由として下顎自体の位置移動あるいは前歯の咬耗による咬合低下があげられるが、抜歯部上下歯槽堤が術後16~24週でほぼ接していること、また術後の模型上で前歯の咬耗がほとんど観察されないことから、主として前者の理由により下顎頭の偏位が起こったのではないかと推察される。

以上のことから、本実験のHA濃度の低下と低分子化は、次のような原因でひき起こされたものと考えられる。すなわち臼歯の支持が喪失することにより、主として咀嚼筋の影響で下顎が後上方に牽引されて下顎に位置移動が起こり、それによって顎関節構成体に異常負荷がかかって滑膜細胞が障害され、慢性外傷性病変が惹起されるという考え方である。また、分子量低下の回復がHA濃度低下の停止とほぼ同時期に起こっていることから、滑膜B型細胞でのHAの合成分泌障害はまだ継続しているものの、GAG分解酵素活性は低下している状態ではないかと推察される。酵素活性の低下については、術後16週から24週にかけて上下顎臼歯部がほぼ接することにより、顎関節構成体にかかる負荷が軽減して、滑膜細胞の崩壊変性に回復傾向が認められ、ライソゾームからの酵素の放出が減少し、さらに細胞変性に伴う毛細血管の選択的透過性と高分子物質取り込み能の制御機構が回復するために起こるのではないかと、すなわち臼歯欠損という状態に対して、生体内で順応が起こりつつあるのではないかと考えられるが、さらに実験期間を延長して生化学的ならびに超微構造的に検討する必要がある。整形外科領域において、滑液、特に膝関節滑液は疾患の診断に日常的に用いられているが顎関節領域では、解剖学的構造の複雑さと、液量が微量なことから滑液は診断には用いられていないのが現状である。また、実験系においても上記の理由により、顎関節滑液について検索したものはほとんどない。先に、森本⁷⁾は、片側咬合

挙上したサル顎関節滑液中のHA量を細管式等速電気泳動装置を用いて測定し、挙上側顎関節滑液中のHAは、術後1週まで減少し、6週以後で回復することを報告しているが、本実験では、定性、定量に加えて分子量分布の検討を行うため、さらに高感度な測定方法を必要とした。武田ら⁴⁴⁾の報告したプレラベル化剤としてダンシルヒドラジンをを用いたウロン酸のHPLC法による定量は、前処理の簡便さと、0.1~20 nMの微量範囲でのウロン酸の定量測定が可能である点から有用と考えられた。そこで生体試料中のウロン酸を定量するために武田ら⁴⁴⁾の方法の応用を検討したところ、HA量とHAを加水分解して得たグルクロン酸のピーク高さとはよく相関する結果が得られた¹³⁾。しかし、HAとCSはともに構成糖としてグルクロン酸を含んでいるためHAとCSが混在する試料では相互の分離定量はできない。このため、CSが混在する試料では、これを酵素消化して得られる不飽和二糖(Δ Di-0 Sと Δ Di-4 S, Δ Di-6 S)レベルでの分析が必要と考えられる。不飽和二糖の分析に本法を応用すれば、臨床的に採取したヒト顎関節滑液中のGAG微量分析が可能となり、顎関節症の診断に寄与するものと考えられる。

HAの鎮痛作用や抗炎症作用⁴⁵⁾についてはすでに報告されているが、HAは、変形性膝関節症患者の治療にも用いられており、大島ら⁴⁶⁾は、変形性膝関節症患者の関節腔内に高分子量HAナトリウムを投与し、臨床項目別評価では、疼痛の改善率が最も高く、また有効率はHAナトリウムの1%水溶液を1週間隔で2.5 ml投与した群で最も高く67.9%であったと述べている。さらに最近、GAGポリ硫酸エステルが、膝関節滑膜のHA合成に対して促進作用を有することが証明され、その臨床応用がなされている。満田ら⁴⁷⁾は、変形性膝関節症の患者にGAG製剤の投与を行い、ほとんどの症例でHAの濃度、粘度の増加に伴って疼痛と歩行能力の改善がみられたと報告している。顎関節領域においても変形性顎関節症患者に対するHAナトリウムの関節腔内注射法が施行されており、ステロイド投与群と比較し、有効性に有意差はなく、副作用の危険性はほとんどないと報告⁴⁸⁾されている。咬合異常に伴う顎関節滑液中のHA濃度の低下および低分子化が顎関節症の誘因になっているとすれば、高濃度、高分子量HAの関節腔への投与は有効な治療法であるが、関節腔内に投与したHAナトリウムはほぼ3日で関節腔内から消失するという報告⁴⁹⁾もあり、投与濃度、回数については今後の検討が待たれるところである。

顎関節症については、本邦において上野⁵⁰⁾が顎関節痛、関節雑音、異常顎運動を主症状とする非炎症性の慢性顎関節疾患の臨床診断名を顎関節症として総括して以来、さまざまな研究が行われ、エックス線技術の進歩や関節鏡視法の発達により診断成績は向上し、それに伴い

治療成績も向上している。現在、臨床的に顎関節症の診断には顎運動機能検査, 筋電図, エックス線解析, MRIなどが用いられているが, それらに滑液の生化学的分析が加われば, 顎関節症に対してより確実な診断基準を設定できるものと考えられる。

結 論

両側臼歯欠損に起因する咬合異常時の顎関節滑液GAGの分子種レベルの動態を生化学的に分析した。

1. 顎関節規格エックス線写真では, 実験群の下顎頭および下顎窩に経日的な形態的变化はほとんど観察されなかったが, 下顎頭の位置的变化は術後16~24週で鼻聴道線を基準として後上方への偏位として観察された。

2. 顎関節滑液GAGは, HAのみで構成されていることがセルロース・アセテート膜電気泳動および酵素消化で確認された。

3. ウロン酸量であらわした滑液中のHA濃度は, 対照群では2.13 mg/mlであり, 実験群では術後16週まで経日的に低下傾向を示し, 16週では対照群の約1/2 ($p < 0.01$) となり, 以後その値に変動はなかった。

4. Sepharose CL 2Bゲル濾過の顎関節滑液GAG溶出位置は, 対照群に比べ, 実験群では術後2週群から16週群まで経日的に遅延し, 24週群ではこの遅延が2週群の位置まで回復する傾向を示した。

以上の結果から, 両側臼歯欠損により, 顎関節構成体に異常な負荷がかかると慢性外傷性病変が惹起され, 顎関節滑液単位容積あたりのHA濃度は術後経日的に低下し, また同時にHAの低分子化傾向をひき起こすことが示唆された。

本論文の一部は, 第1回日本顎関節学会(昭和63年7月2日 名古屋市)で, また要旨は第375回大阪歯科学会例会(昭和63年11月12日 大阪市)で発表した。

なお, 本研究の一部は昭和62年度大阪歯科大学学術研究奨励金助成によりなされたものである。

稿を終えるにあたり, ご懇切なご指導とご校閲をいただきました大阪歯科大学口腔外科学教室第1講座恩師白数力也教授, ならびに大阪歯科大学生化学教室榊 鉄也教授に深甚の謝意を表します。また直接のご指導とご助言をいただきました大阪歯科大学口腔外科学教室第1講座寛道健治講師, 大阪歯科大学生化学教室藤田 厚助教授, 鎌田愛子助手に深謝いたします。さらに, 本研究にご協力くださった口腔外科学教室第1講座教室員ならびに生化学教室教室員各位に謝意を表します。

引 用 文 献

1) 山崎 博: 片側咬合挙上による両側顎関節の変

化に関する実験的研究. 九州歯会誌 33: 257-280 1979.

2) 喜久田利弘: 片側歯牙欠損によるサル顎関節の病理組織学的研究. 九州歯会誌 34: 254-274 1980.

3) 樋田謙二郎: 両側下顎臼歯部欠損による顎関節への影響に関する実験的研究. 九州歯会誌 36: 136-156 1982.

4) 鬼塚啓史: 咬合挙上冠除去後の顎関節への影響に関する実験的研究. 九州歯会誌 37: 340-359 1983.

5) Ueno, S.: The uptake of horseradish peroxidase in the temporomandibular joint synovium of the rat following unilateral extraction of molars. J Dent Res 61: 516-520 1982.

6) Kubo, Y.: The uptake of horseradish peroxidase in monkey temporomandibular joint synovium after occlusal alteration. J Dent Res 66: 1049-1054 1987.

7) 森本伊智郎: 片側咬合挙上時における顎関節液ヒアルロン酸の量的変動に関する研究. 日口外誌 33: 21-31 1987.

8) 荒木春美, 寛道健治, 他: サル用顎関節規格エックス線撮影法の基礎的検討と撮影装置の考案. 口科誌 37: 600-608 1988.

9) Hata, R. and Nagai, Y.: A rapid and micro method for separation of acidic glycosaminoglycans by two-dimensional electrophoresis. Anal Biochem 45: 462-468 1972.

10) Ohya, T. and Kaneko, Y.: Novel hyaluronidase from streptomyces. Biochim Biophys Acta 198: 607-609 1970.

11) Yamagawa, T., Saito, H., et al.: Purification and properties of bacterial chondroitinases and chondrosulfatases. J Biol Chem 243: 1523-1535 1968.

12) Bitter, T. and Muir, H.M.: A modified uronic acid carbazole reaction. Anal Biochem 4: 330-334 1962.

13) 鎌田愛子, 荒木春美, 他: 高速液体クロマトグラフィーによるウロン酸の微量定量法. 歯科医学 52: 84-90 1989.

14) Avant, F.B., Averil, C.J., et al.: Changes in the temporomandibular joint of rats caused by alteration in the intermaxillary relationships of the teeth. J Dent Res 31: 499-500 1952.

15) Cimasoni, G.: Histopathology of temporomandibular joint following bilateral extraction of molars in the rats. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 16: 613-621 1963.

16) Furstman, L.: The effect of loss of occlusion upon the mandibular joint. Am J Orthod 51: 245-261 1965.

17) 関 秀孝: 顎関節症の補綴学的研究 第1報 顎関節症患者の咬合に関する研究. 口病誌 35:

- 213-227 1968.
- 18) 鬼塚謙治：顎関節症に関する臨床的研究。九州歯会誌 30: 662-708 1977.
- 19) 林 清平：実験的咬合干渉が咀嚼系に与える影響。歯学 70: 687-764 1982.
- 20) Meyer, K. and Palmer, J. W.: The polysaccharide of vitreous humor. J Biol Chem 107: 629-634 1934.
- 21) 並木 脩：ヒアルロン酸の生理機能および医学的応用について。整形外科 29: 553-561 1978.
- 22) 吉良貞雄：病的関節液の Hexosamine ならびに Acid Mucopolysaccharide に関する研究。日整会誌 41: 1-16 1967.
- 23) 桑野 茂：病的関節液中の酸性ムコ多糖に関する研究。医学研究 39: 199-221 1969.
- 24) Silpananta, P., Dunstone, J.R., et al.: Fractionation of hyaluronic acid preparation in a density gradient. Biochem J 104: 404-409 1967.
- 25) 猪狩 忠編：整形外科 MOOK 32 関節疾患と関節液。第1版，金原出版，東京，1984，24-37 頁。
- 26) Hatton, M.N. and Swann, D.A.: Studies on bovine temporomandibular joint synovial fluid. J Prosthet Dent 56: 635-638 1986.
- 27) 鈴木 禎：各種動物の顎関節円板にみられる軟骨細胞の分布並びに機能的意義について 1. 各種動物の顎関節円板の組織構造。歯報 71: 1311-1336 1971.
- 28) Barland, P., Smith, C., et al.: Localization of hyaluronic acid in synovial cells by radioautography. J Cell Biol 37: 13-26 1968.
- 29) Castor, C.W.: Production of mucopolysaccharides by synovial cells in a simplified tissue culture medium. Proc Soc Exp Biol Med 94: 51-56 1957.
- 30) 近藤 仁：正常および病的ヒト関節液の粘性に関する研究。北里医学 10: 485-498 1980.
- 31) 斎藤直美：関節液の特性—ヒアルロン酸を中心としたグリコサミノグリカンと蛋白について—。中部整災誌 26: 1978-1987 1983.
- 32) Bjelle, A., Andersson, T., et al.: Molecular weight distribution of hyaluronic acid of human synovial fluid in rheumatic diseases. Scan J Rheumatol 12: 133-138 1982.
- 33) Dahl, L., Dahl, I.M., et al.: Concentration and molecular weight of sodium hyaluronate in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and other arthropathies. Ann Rheum Dis 44: 817-822 1985.
- 34) 浅井春雄：血清および関節液ヒアルロニダーゼの比濁定量。日整会誌 41: 708-718 1967.
- 35) Kakudo, K.: Ultrastructural cytochemical studies of horseradish peroxidase uptake by synovial lining cells of the rat temporomandibular joint. Okajimas Folia Anat Jpn 57: 219-240 1980.
- 36) 高久 邇 正常ならびに病的顎関節のX線学的研究。口外誌 7: 203-219 1961.
- 37) Weinberg, L.A.: Correlation of temporomandibular dysfunction with radiographic findings. J Prosthet Dent 28: 519-539 1972.
- 38) 山内哲義，中村公雄，他：顎関節側方X線規格写真による顎頭位の分析方法について。補綴誌 20: 193-206 1976.
- 39) 平田周三：顎関節のX線学的研究—顎関節側斜位撮影法により得られたX線像の分析—。九州歯会誌 32: 374-392 1978.
- 40) 上村修三郎，中村太保，他：顎関節疾患に関するX線診断学的研究—顎関節症における関節の形態的变化について—。歯放 19: 224-237 1979.
- 41) Weinberg, L.A.: Role of condylar position in TMJ dysfunction-pain syndrome. J Prosthet Dent 41: 636-643 1979.
- 42) Weinberg, L.A.: Clinical report on the etiology and diagnosis of TMJ dysfunction-pain syndrome. J Prosthet Dent 44: 642-653 1980.
- 43) 竹之下康治，中村昭一，他：顎関節症のSchüller氏変法X線像による観察。日口外誌 27: 565-572 1981.
- 44) 武田素子，前田昌子，他：プレラベル化剤としてダンシルヒドラジンを用いるウロン酸の高速液体クロマトグラフィ。分析化学 33: 681-683 1984.
- 45) 宮崎匡輔，後藤幸子，他：Sodium Hyaluronate (SPH)の鎮痛作用および抗炎症作用。応用薬理 28: 1123-1135 1984.
- 46) 大島良雄，東 博彦，他：変形性膝関節症に対する高分子量ヒアルロン酸ナトリウム (SPH) の関節腔内注射療法—他施設共同研究による臨床第Ⅱ相試験—。薬理と治療 11: 2253-2267 1983.
- 47) 満田基温，山本浩司，他：変形性膝関節症に対するアルテパロン®の使用経験—膝関節液の分析と臨床効果の対比—。医学と薬学 14: 1363-1368 1985.
- 48) Kopp, S., Carlsson, G., et al.: Long-term effect of intra-articular injections of sodium hyaluronate and corticosteroid on temporomandibular joint arthritis. J Oral Maxillofac Surg 45: 929-935 1987.
- 49) 坂本 崇，水野祥二，他：Sodium Hyaluronate (SPH) の体内動態 (第1報) ¹⁴C-SPH のウサギ関節腔内投与における分布，代謝ならびに排泄。応用薬理 28: 375-387 1984.
- 50) 上野 正：顎関節疾患の診断と治療。日歯評論 170: 1-7 1957.