ヒト顎関節摘出標本における CD44 の分布についての免疫組織化学的研究

吉田 博昭・藤田 茂之・飯塚 忠彦

Immunohistochemical study of the CD44 distribution in surgically removed specimens of the human temporomandibular joint (TMJ)

Hiroaki YOSHIDA・Shigeyuki FUJITA・Tadahiko IIZUKA

Abstract: CD44 is an important adhesion molecule that serves as a cell surface receptor for hyaluronic acid and as a homing receptor for lymphocytes.

In this study, we immunohistochemically investigated the expression of CD44 in 12 human temporomandibular joint (TMJ) discs.

Four types of CD44 expression were found: (1) around round cells at the surface of the synovial membrane; (2) around round cells in the connective tissue, apparently indicating homing receptors for lymphocyte; (3) at the stroma of the synovial membrane; and (4) beneath vascular epithelial cells, apparently indicating cell surface receptors for hyaluronic acid.

No appreciable expression of CD44 was observed in specimens taken from a patient with an immobile disc because of contralateral TMJ ankylosis.

Key words: temporomandibular joint (顎関節), lymphocyte (リンパ球), hyaluronic acid (ヒアルロン酸), CD44 Immunohistochemistry (CD44 免疫組織化学)

緒 言

従来、顎関節症は、顎関節部を中心とする疼痛、開口障害や、顎運動時の関節雑音などを主症状とし、かつ臨床的に明らかな炎症症状を欠く疾患であると認識されてきた¹⁾。しかし、最近では、多くの症例で顎関節滑膜の炎症性変化が生じていることが明らかになってきている^{2, 3)}。

これら滑膜の炎症性変化を調査する生化学的方法として関節液の分析が行われ、膝関節では、とくにグリコサミノグリカンの組成やヒアルロン酸の濃度や分子量に変化があることが、認められている^{4~6)}。一方、顎関節においては関節液の量がきわめて微量で採取が困難であることもあって、これらに関する報告は少ない^{7~9)}。

今回、われわれは、ヒトにおけるリンパ球のホーミングレセプター、さらにヒアルロン酸のレセプターであるとされる CD44 についてのヒト顎関節円板摘出標本における発現を免疫組織化学的に分析した。なお、同症例の顎関節症の臨床症状ならびに顎関節の病理組織学的変化との関連についても調査した。

材料および方法

1. 材料

1) 対象症例

最近1年間に[]大学[]部[]を受診し、各種顎関節疾患により関節円板摘出術を施行された20歳から72歳までの男性4例5関節、女性5例5関節、さらに新鮮屍体(死後12時間)の1剖検例により得られた両側関節の計10例12関節の顎関節円板ならびに周囲組織である。

2) 顎関節円板摘出症例の臨床症状

症例1, 2は、舌悪性腫瘍の全身転移により当科で死去され、病理解剖剖検より得られた対照症例である。生前には左側、右側ともに顎関節部に臨床症状は認め

京都大学医学部口腔外科学教室

(主任: 飯塚忠彦教授)

Department of Oral and Maxillofacial Surgery,
Faculty of Medicine, Kyoto University (Chief: Prof.
Tadahiko Iizuka)

受付日: 平成7年12月4日

表1 顎関節円板摘出症例の臨床症状

症例	臨床診断名	左右	年齢	性	発症から手術 までの期間	関節 疼痛	関節 雑音	開口度 (mm)	顎関節円板 前方転位	円板 穿孔	OA 変化	RA 既往	前処置
1	(対照)	左	61	女				40					
2	(対照)	右	61	女				40	±				
3	顎関節強直症	左	36	男	36年 0か月			3					
4	Ⅱ＋Ⅲ型	右	20	女	2年 2か月	⦶	+	32	+				D, S, M, A
5	Ⅳ型	右	32	男	4年 3か月	⦶	+	40	+				D, S, B
6	Ⅳ型	左	32	男	4年 8か月	⦶		40					D, S, B
7	Ⅲ＋Ⅳ型	左	36	女	5年 3か月	+	+	32	+				D, S, A
8	Ⅳ型	左	52	女	1年 6か月	+	+	39	+	+	+		D, S, M
9	Ⅳ型	右	57	女	1年 4か月	⦶		25	+	+	+		D, S,
10	Ⅰ＋Ⅳ型	左	64	男	4年 10か月	⦶		45	+		+		D, S, P
11	Ⅳ型	左	72	女	2年 9か月	⦶		37	+	+			D, S
12	Ⅳ型	右	72	男	1年 6か月	⦶		18	+		+		D, S, A

関節疼痛

- ⦶ : 鎮痛剤を服用しても疼痛の残るもの
- ⦶ : 鎮痛剤の服用により疼痛の消失するもの
- ＋ : 鎮痛剤の必要ない自制内の疼痛
- 空白 : 疼痛のないもの

前処置

- D : 筋弛緩剤、鎮痛剤などの薬物療法
- S : スプリント療法
- M : マニプレーション療法
- P : パンピング療法
- A : 顎関節鏡視下手術
- B : 各種神経ブロック

られなかったが、剖検の際に右側にわずかな前方転位が存在した。症例3は、開口度3mmという強度の右側顎関節強直症のため出生直後よりほとんど機能していない対側（左側）の顎関節円板である。症例4から12は、すべて疼痛を伴う顎関節症であり、前方転位を伴うものが8例、円板穿孔が3例、OA（骨変形性顎関節炎）変化が4例、RA（リウマチ性顎関節炎）の既往歴のみられたものは皆無であった（表1）。

2. 方法

1) 固定・包埋・切片作製

手術により得られた組織は4%パラホルムアルデヒド固定の後、パラフィン包埋後、5μm厚で矢状方向の連続組織切片を作製した。

2) 病理組織学的検索

ヘマトキシリン－エオジン染色ならびにトルイジンブルー染色を行った。

3) 免疫組織化学的検索

染色法はすべて通法どおりの間接酵素抗体法により行った。1次抗体は、生化学工業社製の抗マウスCD44モノクローナル抗体を100倍希釈し、4℃で12時間反応させた。PBS洗浄後、2次抗体反応を行った。2次抗体は、CAPPEL社製のHRP標識抗マウスIgG抗体を200倍希釈し、室温で1時間反応させた。さらに、DAB（3-3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride）にて呈色反応を行い、ヘマトキシリン染色の後、透徹、封入した。なお、同時に1次抗体

のかわりに正常マウス血清を併用した陰性対照試験を行い、すべてが陰性であることを確認した。

本研究では、摘出された円板は、矢状方向で外側翼突筋付着部を内側部とし、残りを2分割し外側部と中央部とした。さらに、得られた切片は前後的に顎関節円板部と前方結合組織部と後方結合組織部に分類し、上下的には上関節腔表層と下関節表層と内部とに分類し9つの部位についてそれぞれCD44の陽性部位について観察した。

結 果

CD44の陽性部位は、大別して、1)滑膜表層部の円形細胞表面、2)前方および後方部結合組織内の円形細胞表面、3)滑膜浅層部間質、4)結合組織内の毛細管周囲組織間質の4通りの発現を示した（表2）。ほぼすべての症例に認められた発現様式は、1)であり、とくに前後の滑膜と関節円板との移行部付近や肥厚増生した滑膜に取り込まれるように白血球様の円形細胞の表面に発現が認められ、滑膜表層部に局在していた（写真1, 2）。さらに、2)の発現様式を示したものは、症例1, 2, 11, 12の計4例であり、1)と同じく白血球様の円形の表面に発現が認められた（写真3）。3)と4)の発現様式を示したものは症例2, 9, 11, 12の4例であり、滑膜表層下浅部組織や毛細管周囲組織の間質に発現がみとめられた（写真4, 5, 6）。

表2 顎関節円板摘出標本におけるCD44の局在

症例	内側部			中央部			外側部			症例	内側部			中央部			外側部		
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	7	+	／	／	／	／	／	／	+	／
												／	／	／	／	／			／
			+	+	+	+		+			+	／	／	／	／	／	／	+	／
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8	／	／	／					+	／
											／	／	／						／
	+										／	／	／		+				／
3										9	／	／	／	／	／	／		+	／
											／	／	／	／	／	／		+	／
											／	／	／	／	／	／			／
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10	+			+			+	+	／
																			／
	+	+	+	+	+	+	+	+	+								+		／
5		+					／	／	／	11	／	／	／	／	+	+	／	+	／
							／	／	／		／	／	／	／	+	+	／	+	／
							／	／	／		／	／	／	／	+	+	／	+	／
6	+	／			／			／	／	12	／		+		+				／
		／			／			／	／		／			+	+				／
		／			／			／	／		／	+	+		+	+			／

上関節腔前方滑膜表層	上関節腔関節円板表層	上関節腔後方滑膜表層	+	著しく多数の発色がみとめられる
前方部結合組織内部	顎関節円板内部	後方部結合組織内部	+	多数の発色がみとめられる
下関節腔前方滑膜表層	下関節腔関節円板表層	下関節腔後方滑膜表層	+	数個の発色がみとめられる
			空白	全く発色がみとめられない
			／	標本として摘出できなかった部位

一方、顎関節円板には、CD44の局在は、きわめて少なかった(表2)。

対照症例1, 2においてはCD44の陽性部位について他の顎関節症症例との間に大きな差は認められなかったが、症例3においてはCD44の発現が、きわめて少なかった。

その他、顎関節症症例間での、年齢、性差、罹病期間や、関節雑音、関節疼痛、開口度などの臨床症状、関節円板の前方転位、関節円板穿孔、OA変化、術前までの処置内容、病理組織学的変化などとの相関性を検索したが、症例ごとのCD44の発現様式や陽性部位とのあいだに特別な傾向や関連性は認められなかった。

考 察

近年、顎関節腔造影やMRIなどを中心とした画像診断法の進歩や顎関節腔内を直接観察する顎関節鏡視

検査法、顎関節鏡視下手術法の開発により、各種顎関節疾患や顎関節症の病態として関節円板の変形、穿孔、癒着や関節円板の前方転位を主とした位置異常の他、円板後部組織の進展、断裂、滑膜の炎症性変化などの顎関節腔内部軟組織の形態的異常が注目されるようになった¹⁰⁾。しかし、これらの形態異常に関して、細胞外基質や細胞接着分子、特にCD44に関する免疫組織化学的分析を行った報告は少ない^{11, 12)}。

一般に、細胞接着分子の作用部位は、1)細胞-細胞外基質間、2)細胞-細胞間(同種または異種細胞間)に大別され、発生、分化、器官形成等の生命現象のみならず、炎症性疾患や癌転移においてもきわめて重要な役割を果たしている。

その中でCD44は、ヒトT cell, B cell, 単球、顆粒球、赤血球、脳、線維芽細胞、ケラチノサイトなど多種類の細胞に発現されている¹³⁾。その作用は、細胞-細胞外基質の相互作用に関与する接着分子で、カラー

写真1 リンパ球ホーミングレセプター様に発現の見られる白血球様の円形細胞(矢印)が滑膜に取り込まれるように確認される。(症例4)

写真4 肥厚した滑膜に著明なリンパ管の新生が生じ、その近接した部位にヒアルロン酸レセプター様の発現(矢印)が確認される。(症例9) Lは、リンパ管

写真2 リンパ球ホーミングレセプター様に発現の見られる白血球様の円形細胞(矢印)が滑膜層内に確認される。(症例10)

写真5 滑膜表層下の浅部組織の間質にヒアルロン酸レセプター様の発現(矢印)が確認される。(症例11)

写真3 リンパ球ホーミングレセプター様に発現の見られる白血球様の円形細胞(矢印)が後部結合組織内に確認される。(症例11)

写真6 毛細管周囲組織の間質にヒアルロン酸レセプター様の発現(矢印)が確認される。(症例12)

ゲン、ファイブロネクチン、ヒアルロン酸などをリガンドする細胞表面レセプターであるとともに、ヒトリンパ球のホーミングレセプターともされている¹⁴⁻¹⁶⁾。

一方、顎関節症においては、滑膜に種々の炎症性変化が生じていることが報告されているが^{2, 3)}、これら滑膜の炎症性変化を調査する方法として関節液の生化学的分析が行われている⁷⁾。

これらの報告によると、顎関節滑液のほとんどは血漿液からなる成分で、これに滑膜や周囲組織から合成分泌されたと考えられるヒアルロン酸とタンパクからなる複合体が加わったものによって構成され、関節への栄養の供給や機械的な関節機能を維持している。したがって、正常な顎関節滑液は血漿由来タンパクとヒアルロン酸が主体となったプロテオグリカンによって構成されている。

滑液中のヒアルロン酸の作用には、関節軟骨表面を被い軟骨の硫酸化ムコ多糖類の関節内への流出の防止をし、関節軟骨を正常な状態に維持すること、組織に必要な栄養源としての可溶性蛋白の供給、細菌・毒素・免疫複合体のバリアーの働き、軟骨におけるプロテオグリカンの生合成・リンパ球の幼若化・白血球の食作用の抑制、感染防御作用、肉芽や瘢痕形成の抑制などがある¹⁷⁾。これら関節液中ヒアルロン酸は滑膜細胞で合成されるとされている^{18, 19)}。

ヒアルロン酸は経リンパ流の吸収があるとされるが²⁰⁾、本研究においても、症例9は滑膜の肥厚した表層部にリンパ管の著しい新生がみられ²¹⁾、同部に近接した周囲組織間質にCD44の陽性反応がみられた。陽性反応の存在する部位から推論すると、これらは、ヒアルロン酸レセプター様²²⁾の陽性反応と考えられ、この説を支持する病態を示した。さらに、症例11, 12では、滑膜表層下の浅部組織や毛細管周囲組織の間質に発現がみられた。これらのことより、ヒト顎関節においては、ヒアルロン酸が滑膜や毛細管を介して移動しているものと考察された。

一方、リンパ球のホーミングレセプターとしてのCD44の機能と関節疾患との関連を考察すると、リンパ球のホーミングは、末梢リンパ節、粘膜リンパ節、炎症を起こした関節滑膜液へのホーミングの3つに大別される¹³⁾。

一般的に、慢性炎症病巣には多数のリンパ球浸潤を認めるが、リンパ球の炎症部位への集積に果たすCD44の役割が明らかにされつつある²³⁾。

本研究においても、多くの症例で、顎関節症で一般にみられる円板前方転位により進展した円板後方の滑膜や、前方転位により捻珠状に変形した円板の前方部滑膜にCD44の陽性反応がみられ、陽性反応の存在部位から推論するとリンパ球のホーミングレセプター様²²⁾の陽性反応と考えられた。これらのことより、ヒト顎関節においては滑膜を介してのリンパ球の移動が

行われているものと考察された。

一方で、症例3の対側(左側)の顎関節強直症のため、ほとんど運動機能していない顎関節円板の場合は、CD44の陽性反応がきわめて乏しかった。このことより運動機能のない症例では、ヒアルロン酸や、リンパ球の移動や活性が著しく低下しているものと考察された。

最近の膝関節の研究では、RAの症例で、CD44がA型滑膜、血管内皮細胞、滑液中でも強く発現し、ヒアルロン酸との接着だけでなくサイトカイン産生や、細胞内シグナル伝達にも関与していることが明らかにされ、CD44が、RA滑膜における細胞活性化にも関与していると報告されている^{24, 25)}。

CD44は、この他にもさまざまな機能を有すると思われる、今後も症例ごとの臨床症状による発現の差の定量化などを含め、さらなる調査、研究が必要と思われた。

結 語

1. CD44の局在についてヒト顎関節円板摘出標本12関節において免疫組織化学的分析を行った。

2. リンパ球ホーミングレセプター様の陽性反応は全例で滑膜表面の円形細胞表面に認められ、数例で前方および後方部の結合組織に認められた。

3. 数例にヒアルロン酸レセプター様の陽性反応が、滑膜下浅層や毛細管周囲組織の間質に認められた。

4. 対側の顎関節強直症のため運動機能していない顎関節円板標本では、CD44は、きわめて少ない発現しか認められなかった。

5. 今回の抗CD44抗体を用いた免疫組織化学的分析では、顎関節の円板内部よりも、むしろ周囲の滑膜や結合組織においてCD44の著明な偏在を認めた。このことより運動機能を有する顎関節においては、円板自体よりも周囲の滑膜や結合組織においてリンパ球やヒアルロン酸の活発な移動が行われていることが示唆された。

引 用 文 献

- 1) 上野 正: 顎関節疾患の診断と治療. 日本歯科評論 170: 1-7 1956.
- 2) 村上賢一郎, 松本優典, 他: 顎関節内障の関節造影, 関節鏡視所見と手術所見との比較検討. 関節鏡 11: 1-6 1986.
- 3) 瀬上夏樹, 村上賢一郎, 他: 顎関節内障クロズドロック症例の関節鏡視所見. 口科誌 38: 857-869 1989.
- 4) 斉藤直美: 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.
- 5) Bjelle, A., Andersson, T, et al: Molecular

- weight distribution of hyaluronic acid of human synovial fluid in rheumatic disease. *Scand J Rheumatol* 12: 133-138 1982.
- 6) 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.
- 7) 鈴木 彰: 顎関節内障における関節液の生化学的研究—関節液中ヒアルロン酸の検討—. *口科誌* 40: 753-765 1991.
- 8) 柴田孝典, 溝口智子, 他: 顎関節における滑液の生化学的分析 第2報 グリコサミノグリカンの分析. 第8回日本顎関節学会総会抄録集: 177 1995. (抄)
- 9) 今村英夫, 久保田英朗, 他: 顎関節患者の顎関節滑液分析—特に滑液中の炎症性サイトカイン (IL-1 β , IL-6, IL-8) 濃度について—. 第8回日本顎関節学会総会抄録集: 178 1995. (抄)
- 10) 高久 暹: 変形性顎関節症の病理, とくに関節円板の穿孔創について. *日口診誌* 4: 24-32 1991.
- 11) 滝川俊也, 藤田茂之, 他: ヒト顎関節関節円板の細胞外基質の免疫組織化学的研究. *日口外誌* 38: 836-871 1992.
- 12) 吉田博昭, 藤田茂之, 他: ヒト顎関節手術症例の円板における CD44 の局在についての免疫組織化学的所見 (速報). *日口診誌* 8: 313-318 1995.
- 13) 生田宏一: リンパ球のホーミング・レセプター. *Medical Immunology* 20: 257-261 1990.
- 14) 反町典子, 宮坂昌之: 免疫系の接着分子—特に CD44 について. *実験医学* 12: 2190-2196 1994.
- 15) Haynes, B.F., Telen, M.J., et al: CD44-a molecule involved in leukocyte adherence and T-cell activation. *Immunol Today* 10: 423-428 1989.
- 16) Haynes, B.F., Liao, H.X., et al: The transmembrane hyaluronate receptor (CD44): multiple functions, multiple forms. *Cancer Cells* (Cold Spring Harbor) 3: 347-350 1991.
- 17) 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.
- 18) Castor, C.W.: Production of mucopolysaccharides by synovial cells in simplified tissue culture medium. *Proc Soc Exp Biol Med* 94: 51-56 1957.
- 19) 甲斐允雄: 関節滑液膜の組織培養による研究. *医学研究* 33: 107-118 1963.
- 20) Fraser, J.R.E. et al: Uptake and degradation of Hyaluronan in Lymphatic Tissue. *Biochem J.* 256: 153-158 1988.
- 21) 吉田博昭, 藤田茂之, 他: 滑膜内にリンパ管新生を伴った顎関節円板内穿孔症例の1例—ヒト顎関節円板の手術標本に対する病理組織学的検討. *口科誌* 45: 57-61 1996.
- 22) 反町典子, 宮坂信之: 接着分子の構造と機能 CD44 ファミリー. *Mebio* 10: 43-49 1993.
- 23) 磯田竜太郎: 細胞外基質および間質細胞への活性化 B 細胞の接着機構. *日歯周誌* 35: 301-319 1993.
- 24) Haynes, B., Hale, L.P., et al: Measurement of an adhesion molecule as an indication of inflammatory disease activity. Up-regulation of the receptor for hyaluronate (CD44) in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 34: 1434-1443 1991.
- 25) 小池竜司, 宮坂信之: 慢性関節リウマチ滑膜細胞, 血管内皮細胞接着分子の発現異常. *臨床免疫* 23: 1445-1453 1991.