顎関節クローズド・ロック症例における滑液中の マトリックスメタロプロテアーゼ活性の測定 第2報：マトリックスメタロプロテアーゼ活性と関節鏡視像との関係

由良 晋也・戸塚 靖則・出山 義昭*

Determination of matrix metalloproteinase (MMP) activity in synovial fluid in patients with closed lock of the temporomandibular joint: correlation between MMP activity and arthroscopic findings

Shinya YURA・Yasunori TOTSUKA・Yoshiaki DEYAMA*

Abstract: To clarify the relation between matrix metalloproteinase (MMP) activity in synovial fluid (SF) of the temporomandibular joint (TMJ) and arthroscopic findings of intracapsular lesions, MMP-2, 3, 9 activity in the SF of patients undergoing arthroscopic examination and in the SF of volunteers was determined. SF was obtained from 16 patients (16 joints) with TMJ closed lock and 4 volunteers (6 joints) without TMJ disorders. MMP-2, 3, 9 activity in SF was detected by MMP activity assay with specific substrates for each enzyme.

There was no significant correlation between MMP-2, 3 activity and arthroscopic findings, such as synovitis, cartilage changes, and adhesion. However, MMP-9 activity in SF isolated from joints with severe synovitis, cartilage changes, and adhesion was higher than that in SF obtained from the volunteers.

These results indicate that increased MMP-9 activity is related to the presence of severe synovitis, cartilage changes, and adhesion.

Key words: temporomandibular joint (顎関節), matrix metalloproteinase (マトリックスメタロプロテアーゼ), arthroscopic findings (関節鏡視所見), closed lock (クローズド・ロック)

緒 言

マトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinases: MMPs) は、膝関節における関節鏡視像との比較や鏡視下に採取された組織の分析などから、関節炎や関節破壊に関係する酵素であることが明らかにされている^{1~5)}。顎関節においても、これまでに滑液中の MMPs と関節炎や関節破壊との関係について分析されてきており、活性型 MMP-2, 3, 9 が関節痛や骨変化を有する関節の滑液中に検出されることが報告されている^{6~11)}。ただし、上述の研究においては、関節炎や関節破壊は単に臨床所見や画像所見により評価されているに過ぎず、鏡視下に滑膜や軟骨の状態を直接観察したものではない。

そこで、今回、MMPs 活性と顎関節腔内病変との関係を明らかにする目的で、関節鏡視検査を行ったクローズド・ロック症例と顎関節症のないボランティアを対象として滑液中の MMP-2, 3, 9 活性を測定し、鏡視像と MMPs 活性との関係について検討した。

対 象 と 方 法

1. 患者

北海道大学歯学部附属病院口腔系歯科において、クロー

北海道大学大学院歯学研究科口腔病態学講座口腔顎顔面外科学

(主任：戸塚靖則教授)

*北海道大学大学院歯学研究科口腔病態学講座歯科薬理学

(主任：鈴木邦明教授)

Oral and Maxillofacial Surgery, Department of Oral Patho-biological Science, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University (Chief: Prof. Yasunori Totsuka)

*Dental Pharmacology, Department of Oral Patho-biological Science, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University (Chief: Prof. Kuniaki Suzuki)

受付日：平成13年10月15日

図1 MMP-3 活性の測定法

表1 関節鏡視所見の分類

滑膜炎	なし：拡張や増生のない滑膜血管網 軽度：部分的な滑膜毛細血管の増生 高度：全体的な血管増生と滑膜増生
骨軟骨の変化	なし：滑沢な軟骨 軽度：下顎窩や関節結節軟骨のフィブリレーション 高度：全体的なフィブリレーションと軟骨下骨の一部露出
癒着	なし：癒着なし 軽度：部分的な薄い癒着 高度：全体的な厚い癒着

ズド・ロックと診断された患者のうち、顎関節洗浄療法を行った際に上関節腔滑液を採取し、関節鏡視検査を施行した16名16顎関節の MMP-2, 3, 9 活性レベルを測定した。性別は男1名、女15名で、年齢は16歳から68歳（平均36歳）であった。なお、いずれも MRI 検査により、非復位性関節円板前方転位であることが確認されていた。

2. ボランティア（対照）

MMP-2, 3, 9 活性レベルの正常値を知る目的で、対照として患者と同様の関節鏡視検査を行っていないが、顎関節症状がなく MR 像においても関節円板の転位がないボランティア4名6顎関節から滑液を採取した。ボランティアの性別は男4名で、年齢は24歳から26歳（平均25歳）であった。なお、ボランティアは、関係医局員のうち研究の主旨や起こりうる不快事項を理解したうえで、同意が得られたものから選択された。検体を採取することならびに採取した検体を研究に使用することについては、北海道大学大学院歯学研究科倫理委員会において承認されている。

3. 滑液採取法（希釈回収法）

滑液の採取に際し、まず局所麻酔として顎関節部皮下に1%リドカインを注入した。次いで、23G注射針を上関節腔へ刺入し、1.5mlの生理食塩水で5回以上パンピング操作を繰り返し、希釈された関節滑液を1.0ml以上回収した。パンピング操作の際には、血液が吸引された場合に溶血の影響が少なくなるように、2.0mlロック式ガラスシリンジを用いて緩圧下でゆっくりと注入と吸引を繰り返した。検体の採取後には、希釈された滑液をただちに10000×gで5分間遠心し、上清を分析までの期間-80℃で保管した。

4. 関節鏡視検査および鏡視像（表1）

鏡視検査に際しては、φ0.8mmの細径ファイバースコープシステム、ソリッドファイバースコープMS-611®（メディカルサイエンス社製）を用いて、滑膜炎や骨・軟骨の変化、癒着の有無や程度について観察した。

滑膜の所見については、拡張や増生のない滑膜血管網を滑膜炎なし、部分的な滑膜毛細血管の増生を軽度滑膜炎、全体的な血管増生と滑膜増生を高度滑膜炎に分類した。

骨・軟骨の変化については、表面滑沢なものを変化なし、下顎窩や関節結節軟骨のフィブリレーションを軽度変化、全体的なフィブリレーションと軟骨下骨の一部露出を高度変化に分類した。

癒着所見については、癒着がないものを癒着なし、部分的な薄い癒着を軽度癒着、広範囲の厚い癒着を高度癒着に分類した。

5. タンパク量の測定

滑液中のタンパク量の定量には、Bradford法を用いたBio-Rad Protein Assay®（Bio-Rad, U.S.）を使用した。

6. MMP-3 活性の測定（図1）

MMP-3 活性の測定には、ストロメリシン-1（MMP-3）

Assay Buffer: 50mM Tris-HCl (pH7.6), 1.5mM NaCl, 0.5mM CaCl₂, 1 μM ZnCl₂, 0.01% (v/v) BRIJ™ 35, 0.01% (w/v) ゼラチン

Detection Reagent: 50mM Tris-HCl (pH7.6), 1.5mM NaCl, 0.5mM CaCl₂, 1 μM ZnCl₂, 0.01% (v/v) BRIJ™ 35, 0.01% (w/v) ゼラチン

図2 MMP-2 活性の測定法

Assay Buffer: 50mM Tris-HCl (pH7.6), 150mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 1 μM ZnCl₂, 0.01% (v/v) BRIJ™ 35, 0.01% (w/v) ゼラチン

Detection Reagent: 50mM Tris-HCl (pH7.6), 150mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 1 μM ZnCl₂, 0.01% (v/v) BRIJ™ 35に溶解したウロキナーゼ

図3 MMP-9 活性の測定法

活性測定キット YU-26001® (ヤガイ中央研究所, 山形) を用いた。ストロメリシン-1 (MMP-3) 活性測定キット YU-26001® のプロトコルに従い, 図1に示す手順で MMP-3 活性を測定した。採取した滑液を 50 μl の単位として, 基質 (FITC カゼイン) 50 μl に加え, さらに蛍光測定調整液 300 μl に加えた後, 蛍光測定により活性を測定した。測定条件は, 励起光 395nm, 蛍光 520nm で, 蛍光分光光度計 F-4010® (日立, 茨城) を使用し, 総活性を測定した。なお, MMP-3 活性の測定値については, 基質 1 μl を 1 分

間で分解する酵素活性を 1 unit とし, タンパク当たりの比活性 (unit/mg protein) として算出した。

7. MMP-2, 9 活性の測定 (図2, 3)

MMP-2, 9 の活性の測定には, MMP-2, 9 activity assay system® (Amersham Pharmacia, UK) を用いた。MMP-2, 9 activity assay system® のプロトコルに従い, 図2および3に示す手順で MMP-2, 9 活性を測定した。採取した滑液を 100 μl の単位として, p-Aminophenylmercuric acetate (APMA) と assay buffer, detection reagent 各 50

表2 関節鏡視所見 (n=16)

鏡視像	なし	軽度	高度
滑膜炎	0	10	6
骨・軟骨	9	4	3
癒着	9	1	6

表3 タンパク量

	タンパク量 mg/ml (平均±SD)
患者 (n=16)	0.53~1.30 (0.78±0.27)
ボランティア (n=6)	0.67±1.01 (0.81±0.22)

表4 MMPs 活性 (平均±SD)

	MMP-2 unit/mg protein	MMP-3 unit/mg protein	MMP-9 unit/mg protein
患者 (n=16)	54.4-344.4 (160.2±75.9)	0.014-0.031 (0.020±0.005)	0.068-0.242 (0.586±0.590)
ボランティア (n=6)	74.3-214.5 (141.4±50.9)	0.015-0.024 (0.020±0.003)	0.109-0.520 (0.226±0.169)

1 unit : 基質 1 μ l を 1 分間で分解する酵素活性

表5 滑膜炎と MMPs 活性との関係 (平均±SD)

滑膜炎の程度	MMP-2 unit/mg protein	MMP-3 unit/mg protein	MMP-9 unit/mg protein
ボランティア (n=6)	74.3-214.5 (141.4±50.9)	0.015-0.024 (0.020±0.003)	0.109-0.520 (0.226±0.169)
軽度 (n=10)	54.4-205.4 (140.6±50.8)	0.014-0.023 (0.018±0.003)	0.068-0.971 (0.423±0.319)
高度 (n=6)	106.5-344.4 (193.4±69.4)	0.018-0.031 (0.024±0.004)	0.245-2.419 (0.911±0.537)

1 unit : 基質 1 μ l を 1 分間で分解する酵素活性 *p=.028

*

μ l を加えた後、ペプチド基質 (S-2444TM peptide) に加え、分解された基質の発色強度を測定することにより活性を測定した。測定には、マイクロプレートリーダー SPECTRA Classic[®] (TECAN, Australia) を使用し、吸光度405nm で総活性を測定した。なお、MMP-2, 9 活性の測定値については、基質 1 μ l を 1 分間で分解する酵素活性を 1 unit とし、タンパク当たりの比活性 (unit/mg protein) として算出した。

8. 検討法

滑膜炎や骨・軟骨変化、癒着を呈した関節の滑液中 MMP-2, 3, 9 活性と、対照としたボランティアの活性レベルとを比較することにより、これらの関節腔内病変と MMPs 活性との関係について検討した。

統計学的解析には Mann-Whitney U test を用いて検定し、 $p<0.05$ を有意とした。

結 果

1. 関節鏡視像 (表2)

滑膜炎については、滑膜炎なしが 0 関節、軽度が 10 関節、高度が 6 関節であった。骨・軟骨の変化では、変化なしが 9 関節、軽度が 4 関節、高度が 3 関節であった。癒着については、癒着なしが 9 関節、軽度が 1 関節、高度が 6 関節であった。

2. タンパク量および MMPs 活性 (表3, 4)

患者とボランティアのタンパク量および MMPs 活性レベルは表3, 4 に示す通りで、患者とボランティアとの間に有意な差は認められなかった。

3. 滑膜炎と MMPs 活性との関係 (表5)

MMP-2, 3 活性では、高度の滑膜炎が観察されたものでやや高値を示したが、ボランティアと軽度ならびに高度の滑膜炎との間に有意な差は認められなかった。一方、MMP-9 では、ボランティアが平均 0.226 unit/mg

表6 骨・軟骨の変化と MMPs 活性との関係 (平均±SD)

骨・軟骨の変化	MMP-2 unit/mg protein	MMP-3 unit/mg protein	MMP-9 unit/mg protein
ボランティア (n=6)	74.3-214.5 (141.4±50.9)	0.015-0.024 (0.020±0.003)	0.109-0.520 (0.226±0.169)
なし (n=9)	54.4-182.3 (131.3±46.7)	0.014-0.023 (0.018±0.004)	0.068-0.924 (0.357±0.356)
あり (n=7)	106.5-344.4 (197.8±92.8)	0.018-0.031 (0.021±0.006)	0.245-2.419 (0.929±0.796)

1 unit : 基質 1 μ l を 1 分間で分解する酵素活性 *p=.045, **p=.018

表7 癒着と MMPs 活性との関係 (平均±SD)

癒着	MMP-2 unit/mg protein	MMP-3 unit/mg protein	MMP-9 unit/mg protein
ボランティア (n=6)	74.3-214.5 (141.4±50.9)	0.015-0.024 (0.020±0.003)	0.109-0.520 (0.226±0.169)
なし (n=9)	54.4-282.3 (128.6±47.5)	0.014-0.018 (0.017±0.002)	0.068-0.924 (0.386±0.279)
あり (n=7)	115.7-344.4 (201.2±89.2)	0.018-0.031 (0.022±0.006)	0.245-2.419 (0.885±0.820)

1 unit : 基質 1 μ l を 1 分間で分解する酵素活性 *p=.029

protein, 軽度の滑膜炎が平均0.423 unit/mg protein, 高度の滑膜炎が平均0.911 unit/mg protein と, 滑膜炎の進行に伴い活性が上昇する傾向を示し, 高度の滑膜炎が観察されたものでは対照に比較して有意に高い活性が認められた。

4. 骨・軟骨の変化と MMPs 活性との関係 (表6)

骨・軟骨の変化については, ボランティアの関節数と比較して軽度変化および高度変化の関節数が少なく, 統計学的解析が困難であったことから, 軽度の4関節と高度の3関節を合計した7関節を変化ありとし, ボランティア6関節と骨・軟骨の変化なし9関節, 変化あり7関節との間で比較した。MMP-2, 3では, 骨・軟骨の変化の有無にかかわらず, ボランティアと比較して明らかな活性の上昇はみられなかった。一方, MMP-9では, ボランティアが平均0.226 unit/mg protein, 変化なしが平均0.357 unit/mg protein, 変化ありが平均0.929 unit/mg protein と, 骨・軟骨変化が観察されたもので有意に高い活性が認められた。

5. 癒着と MMPs 活性との関係 (表7)

癒着についても, 骨・軟骨の変化と同様の理由で, 軽度の1関節および高度の6関節を合計した7関節を癒着ありとし, ボランティア6関節と癒着あり7関節, 癒着なし9

関節との間で比較した。MMP-2, 3では, 癒着の有無にかかわらず, ボランティアと比較して明らかな活性の上昇はみられなかった。一方, MMP-9では, ボランティアが平均0.226 unit/mg protein, 癒着なしが平均0.386 unit/mg protein, 癒着ありが平均0.885 unit/mg protein で, 癒着が観察されたものでは対照に比較して有意に高い活性が認められた。

考 察

クローズド・ロック症例を対象として滑液中の MMPs を分析したこれまでの報告において, MMPs は関節痛や骨変化を示す症例で強く検出されることから, 関節炎や骨破壊に関与する酵素であると考えられている⁶⁻¹¹⁾。しかし, これまでの研究では, 臨床症状や画像所見から関節炎や骨の変化を診断しているものは多いものの, 画像所見のみでは検知することが困難である滑膜や滑膜血管の状態, 軟骨面の状態, 癒着の有無を関節鏡視検査により観察し, MMPs との関係进行调查したものはない。

線維性癒着は, 滑膜炎が引き金となり滑膜線維芽細胞により形成されと考えられていることから¹³⁾, MMPs は滑膜炎を介して癒着の形成に関与しているものと考えられ

る。一方、MMP-2, 3, 9 は、線維を構成する細胞外基質である種々のコラーゲンやフィブロネクチン、ラミニンなどに基質特異性を有することから¹⁴⁾、癒着の形成とは逆に分解にも関与している可能性もある。

そこで、本研究では、クローズド・ロック症例を対象として関節鏡視検査を行い、滑膜炎、骨・軟骨の変化、線維性癒着の有無ならびに程度を観察し、MMPs 活性との関係を比較検討した。なお、顎関節における MMPs 活性の正常値は未だ明らかでないことから、画像検査で異常が認められず、かつ関節症状のないボランティアの滑液中 MMPs 活性を対照として用いた。検体数が少ないため、測定値には誤差による影響が危惧されたが、ボランティアの滑液中 MMPs 活性の測定値には極端にはずれたものではなく、また標準偏差も小さかったことから、対照とみなしてさしつかえないものと考えられた。

1. MMPs 活性と滑膜炎との関係

MMP-9 活性は、滑膜炎の進行に伴って上昇し、高度の滑膜炎が観察されたもので著明に上昇していた。MMPs はサイトカインや起炎物質などにより産生が調節されていることが知られており、関節においては関節炎が MMPs の産生を誘発する因子の 1 つであると考えられている^{7, 14)}。実際、リウマチ患者の膝関節では、滑膜炎が観察される部位の滑膜線維芽細胞や炎症細胞で、MMP-9 の産生が著しいことが報告されている^{2, 3)}。一方、産生された MMP-9 が活性化すると細胞外基質分解能を発揮することから、MMP-9 は関節炎により産生されるばかりでなく、関節炎を誘発ないし増悪させる因子ともなっているものと考えられる⁷⁾。本研究で、部分的な軽度の滑膜炎を呈したものにおいても MMP-9 活性に上昇傾向が認められたことから、クローズド・ロック症例においても、滑膜炎が生じたことにより MMP-9 が産生ならびに活性化されるものと考えられた。また、炎症の範囲が滑膜全体に及ぶ高度の滑膜炎で MMP-9 活性が著明に上昇していたことから、MMP-9 は活性が上昇するに伴って滑膜を構成する細胞外基質を広い範囲で分解し、滑膜炎を増悪させるものと考えられた。

2. MMPs 活性と骨・軟骨の変化との関係

MMP-2, 3 では、骨・軟骨の変化の有無にかかわらず、ボランティアと比較して明らかな活性の上昇はみられなかったが、MMP-9 では、骨・軟骨変化が観察されたもので有意に高い活性が示された。MMP-9 は、滑膜炎を生じた滑膜内の好中球やマクロファージから産生され^{2, 3)}、活性化するとプロテオグリカンやⅢ～Ⅴ型コラーゲンなどを分解し、線維軟骨を破壊することが知られている¹³⁾。本研究においても、MMP-9 活性は滑膜炎ならびに骨・軟骨の損傷が観察されたもので有意に上昇していたことから、MMP-9 は活性の上昇に伴って細胞外基質破壊能を発揮

し、線維軟骨や骨の破壊に関与しているものと考えられた。

Kubota らは、顎関節 MR 像で骨の変化が著明であった症例の滑液中に、ゼラチンザイモグラムにより活性型 MMP-2, 3, 9 が検出されたことから、これらの活性型酵素の存在は、骨・軟骨損傷の発現を示す、あるいは予期する指標になりうるかと報告している^{6, 7)}。活性を測定した本研究では、骨・軟骨の変化と MMP-2, 3 活性との間に明らかな関係は示されなかった。この結果は、軟骨のフィブリレーションや軟骨下骨の露出が発現する段階において、細胞外基質分解に対する MMP-2, 3 の関与が少ないことを示唆するものと考えられた。一方、MMP-9 活性は軟骨のフィブリレーションが観察された時点で明らかな上昇を示したことから、MMP-9 活性の上昇は画像検査では検出が困難な軟骨変化の存在を示す指標になりうるものと思われる。また、軟骨に引き続いて骨の破壊が起きると考えられていることから¹⁴⁾、MMP-9 活性の上昇は、画像検査で骨変化が観察されない関節において、将来、骨破壊が発現する可能性を予期する指標にもなりうるものと思われる。

3. MMPs 活性と癒着との関係

線維性癒着は、滑膜炎の炎症が引き金となって、滑膜線維芽細胞が活性化されることにより形成されるものと推察されている¹²⁾。一方で、クローズド・ロック症例の上関節腔鏡視像において、後方腔では前方腔と比較して滑膜炎の発現頻度や程度が強いにもかかわらず、癒着の程度は逆に弱いことが知られている¹⁵⁾。このように、癒着の形成のメカニズムについては、未だ不明な点が少なくない。

本研究において、MMP-9 活性が癒着を認めたもので上昇していたことから、この酵素が癒着の形成に何らかの役割を果たしている可能性があるものと考えられる。しかし、癒着が存在する関節には滑膜炎や骨・軟骨の変化を伴うものが少なくなく、癒着の存在するもので見かけ上 MMP-9 活性が上昇した可能性を否定できず、癒着の形成に関してこの酵素が直接的な役割を果たすか否かを明らかにすることはできなかった。

結 語

関節鏡視検査を行ったクローズド・ロック症例と顎関節症のないボランティアの滑液中 MMP-2, 3, 9 活性を測定し、患者とボランティアとの間で比較した。

MMP-2, 3 活性と鏡視像との間に明らかな関連は認められなかった。一方、MMP-9 では、高度の滑膜炎および骨・軟骨の変化、癒着を認めたもので有意に活性が上昇していた。

MMP-9 活性は、滑膜炎や骨・軟骨の変化、癒着と関連して上昇することが示された。

引用文献

- 1) Kikuchi, H., Shimada, W., et al.: Significance of serine protease and matrix metalloproteinase system in the destruction of human articular cartilage. *Clin Exp Pharmacol* 23: 885-889 1996.
- 2) Ahren, D., Koch A.E., et al.: Expression of matrix metalloproteinase 9 (96kd gelatinase B) in human rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 39: 1576-1582 1996.
- 3) Seki, M., Uzuki, M., et al.: Matrix metalloproteinase (MMP-9) in patients with rheumatoid arthritis. *Ryumachi* 35: 791-801 1995.
- 4) Ishiguro, N., Obata, K., et al.: Determination of stromelysin-1, 72 and 92 kDa type IV collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), and TIMP-2 in synovial fluid and serum from patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 23: 1599-1604 1996.
- 5) Goto, H., Yamada, H., et al.: Levels of matrix metalloproteinase-3 and urokinase-type plasminogen activator in knee synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Ryumachi* 37: 3-8 1997.
- 6) Kubota, E., Imamura, H., et al.: Interleukin 1 β and stromelysin (MMP 3) activity of synovial fluid as marker of osteoarthritis in the temporomandibular joint. *J Oral Maxillofac Surg* 55: 20-27 1997.
- 7) Kubota, E., Kubota, T., et al.: Synovial fluid cytokines and proteinases as marker of temporomandibular disease. *J Oral Maxillofac Surg* 56: 192-198 1998.
- 8) Kubota, T., Kubota, E., et al.: Identification of matrix metalloproteinases (MMPs) in synovial fluid from patients with temporomandibular disorder. *Eur J Oral Sci* 106: 992-998 1998.
- 9) Zardeneta, G., Milam, S.B., et al.: Detection and preliminary characterization of matrix metalloproteinase activity in temporomandibular joint lavage fluid. *Int J Oral Maxillofac Surg* 27: 397-403 1998.
- 10) 藤田宏人, 森杉敏明, 他: 蛍光基質ペプチドを用いた顎関節滑液中の MMP 活性測定法の検討. *日顎誌* 10: 534-546 1998.
- 11) Ishimaru, J.I., Oguma, Y., et al.: Matrix metalloproteinase in serum and lavage synovial fluid of patients with temporomandibular joint disorders. *Br J Oral Maxillofac Surg* 38: 354-359 2000.
- 12) Murakami, K., Segami, N., et al.: Correlation between pain and dysfunction and intra-articular adhesion in patients with internal derangement of the temporomandibular joint. *J Oral Maxillofac Surg* 50: 705-708 1992.
- 13) 坂倉照好編: 細胞外マトリックス. 第1版, 羊土社, 東京, 1995, 88-99頁.
- 14) Quinn, J.H.: Pathogenesis of the temporomandibular joint chondromalacia and arthralgia. *Oral Maxillofac Surg Nor Amer* 1: 47-58 1989.
- 15) 戸塚靖則, 津山昌嗣, 他: 顎関節クローズド・ロック症例における関節腔内病変の関節鏡視所見について. *日顎誌* 4: 67-80 1992.