九州歯会誌 57 (4) : 100 ~ 106, 2003.

顎関節疾患の病態形成における細胞と 細胞外マトリックスについての研究

高 橋 哲

九州歯科大学口腔外科学第2講座

平成15年8月20日受付

平成15年8月25日受理

Role of Cells and Extracellular Matrices in Temporomandibular Disorders

Tetsu Takahashi

Second Department of Oral and Maxillofacial Surgery,
Kyushu Dental College, Kitakyushu, Japan

Abstract

Recently, many lines of evidence indicated that variable degrees of inflammation exist in temporomandibular disorders (TMD). Synovial fluid (SF) analysis of the temporomandibular joint (TMJ) has revealed that a variety of inflammatory mediators and components of the matrices of the articular cartilage are detectable in the TMJ. We performed SF analysis for the inflammatory cytokines and nitric oxide (NO) in the SF of the TMJ. It is demonstrated that cytokines such as interleukin 1 (IL-1) are frequently detectable in the SF from patients with TMD, not from the asymptomatic controls. Nitric oxide was also detectable mainly from the patients. Furthermore, inducible nitric oxide synthase (iNOS) was expressed in the synovium of the patients with TMD. Hyaluronic acid (HA), a high-molecular-weight polysaccharide, plays a major role in joint lubrication. We demonstrated that the molecular weight of HA in SF from patients with TMD, not from healthy volunteers, is decreased. These data suggested that IL-1 and NO seem to be related to the pathophysiology of the certain types of the TMD. These data also suggested that mechanical stress caused by overloading results in the generation of free radicals such as NO. These radicals may cause degradation of hyaluronic acid, which in turn impairs the joint lubrication and function in patients with TMD.

Key words: Synovial fluid analysis/Temporomandibular joint/Cytokine/Hyaluronic acid/degradation/Free radical/Nitric Oxide/Tempomandibular disorders

はじめに

顎関節症は従来非炎症性疾患と定義されてきた。しかし近年 MRI などの画像診断の急速な進歩、さらに顎関節など小関節への関節鏡の応用などにより、顎関節症のなかでも円板の位置異常による顎関節内障や、骨軟骨の破壊を伴う変形性顎関節症の病態形成に、種々の炎症反応、それに伴う免疫応答が他の関節と同様に起こっていることが明らかになってきた。本総説では、顎関節症、特に顎関節内障および変形性顎関節症の病態形成における細胞生物学的アプローチについて、最近の知見とわれわれが進めている研究について述べる。

顎関節を構成する細胞と細胞外マトリックス

顎関節は他の関節同様滑膜性関節であり、骨端部を被う関節軟骨、連結・支持を司る関節包、関節の栄養・維持に必要な不可欠な滑膜、運動の円滑化を担う関節円板よりなる。軟骨は少量の軟骨細胞と軟骨マトリックスよりなる。他の滑膜性軟骨が硝子軟骨であるのに対し、顎関節は定型的な硝子軟骨と異なり、むしろ線維軟骨に近いとされ¹⁾、関節面線維層はⅠ型コラーゲンが主体をなし、軟骨層はⅡ型コラーゲンが主体をなしている²⁾。顎関節も他の関節同様、関節軟骨の栄養は滑液を介しての拡散のみの経路で、純物理的な機構によって行われている。関節円板は緻密な膠原線維で構成されており、その役割としては、①衝撃の吸収、②骨関節表面の適合性の改善、③複雑な運動の容易化、④加重の分配、⑤関節表面周囲の保護、⑥潤滑液の分散、などである。

顎関節滑膜は、下顎頭軟骨面、関節円板および下顎窩軟骨面を除く関節包の内面を被覆し、1～3層の表層細胞とその直下の血管に富む疎性結合組織とからなり、基底膜を有していない。滑膜表層細胞は、①主として貪食作用を行うマクロファージに類似したA型細胞と、②滑液成分を産生し、線維芽細胞に類似したB型細胞の2種類に大別される。

滑膜の機能としては、滑液成分の産生、関節腔内に生じた局所代謝物などの排除、滑液の量や組成の制御、血液—関節関門機能などが挙げられる。

滑液は血漿の限界濾過液とヒアルロン酸からなり、関節軟骨および関節円板の栄養と、関節の潤滑という2つの機能を有する。また滑液は関節内に生じた変化に対応して量的、質的に変化をきたす。通常、正常な顎関節の滑液量はごく少量で(平均20μL)³⁾、滑膜の選択的透過性によりタンパク濃度は血漿に比較して低くなってい

る。しかし滑膜炎などの炎症が起きると血管透過性の亢進により、タンパク濃度が上昇する⁴⁾。したがって関節疾患に伴う滑液の量的ないし質的变化を生化学的に検索することにより、関節内病変が把握できる。

顎関節内障および変形性顎関節症の関節内病態

1975年、大西⁵⁾によって関節鏡が顎関節に応用され、これら顎関節内障クローズドロックや変形性顎関節症患者の関節内病態の把握について、著しい発展がもたらされた⁶⁻⁷⁾。関節内病変として、①滑膜炎、②軟骨の退行性病変(軟骨軟化症; chondromalasia)、③関節腔内の線維性癒着が挙げられる⁸⁻¹⁰⁾。これらの病変はいずれも顎関節に対する機械的な過重負担が軟骨、骨の変性と滑膜炎を惹起し成立すると考えられており、これらの病態形成には他の関節と同様に、種々の炎症性メディエーターなどの関与が考えられる。

整形外科領域では、種々の関節疾患に応じて滑液が量的、質的に変化することを応用し、滑液中の成分の生化学的な解析によって、RAやOAの早期診断や、スクリーニング、あるいは患者の予後判定を行う目的で滑液解析が行われている。しかしながら顎関節の病態に滑液解析が応用されるようになったのはごく最近である。その理由として①顎関節が狭小であり、分析を行うだけの量の検体が集まりにくい、②原液での滑液採取がむずかしく、希釈法での採取しかおこなえず、検出がむずかしい、③コントロールがとりにくい、などの欠点によるものであった。

しかしサイトカインなどの炎症性メディエーターの測定技術の進歩や顎関節マニピュレーションや関節洗浄療法などの治療の普及などにより、1980年代後半から顎関節の滑液解析は飛躍的に発展した。

顎関節の滑液解析と病態との関連

顎関節疾患との関連において、滑液解析の分析項目として第1に、関節破壊、修復過程に伴ってみられる軟骨マトリックスマーカー、第2にマトリックス成分の組成の調節、分解に関与するサイトカイン、分解酵素など、関節炎に関するマーカーの2つに大別される。

1) 軟骨マトリックスマーカー

関節軟骨は軟骨マトリックスと軟骨細胞よりなり、マトリックスの主成分はコラーゲンとプロテオグリカンである。網目構造を有するコラーゲンネットワークの中に抱水能の高いプロテオグリカンを含有し、軟骨に強靱性と固有の粘弾性を与えている。これらのマトリックス

は、分解、合成が活発に行われており、それらの過程で関節液中に軟骨成分が遊離してくる。したがって、これら軟骨マトリックスの測定は軟骨破壊、修復のマーカーとなる。これらの軟骨マトリックスマーカーのうち、顎関節で報告されているものは、グリコサミノグリカン成分、ケラタン硫酸、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸などが挙げられる。1989年 Smith ら¹¹⁾ は病的な顎関節滑液中にはグリコサミノグリカン (GAG) のフラグメントが増加していることを示した。Israel ら¹²⁾ は、ELISA法を用い、関節鏡視所見で軟骨変性を認める関節では滑液中のケラタン硫酸濃度が上昇していることを示した。1997年 Okazaki ら¹³⁾ は健康人と顎関節症患者の滑液中のコンドロイチン硫酸 (CS) の組成について、HPLCを用いて解析を行い、顎関節症患者のCSの isomer の組成は健康人と異なることを示した。1998年 Shibata ら¹⁴⁾ は、滑液中のCSの isomer の組成をHPLCで解析を行い、コンドロイチン6硫酸 (C6S) とコンドロイチン4硫酸 (C4S) の比が軟骨および滑膜のプロテオグリカンの代謝を反映するとした。また同年 Murakami ら¹⁵⁾ は、クローズドロック患者の滑液中のヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸の異性体と関節鏡視所見とを比較検討し、C4SとC6Sが顎関節の病変に関連すること、さらにヒアルロン酸に対するC4SとC6Sの比が顎関節の病変に関連するとした。これらの報告から、顎関節疾患、特に顎関節内障クローズドロックなどの患者においては、軟骨の変性に伴い、これらの軟骨マトリックスが破壊ないし修復がおきており、プロテオグリカンなどのマーカーの測定は病変を反映する可能性があることが示唆された。

2) 関節炎マーカー

関節炎のマーカーの多くは炎症を惹起したり、調節したりする因子で、炎症性メディエーターともいわれる。これまで様々な炎症性メディエーターが炎症性関節疾患で重要な役割を担っていることが知られている。これらのマーカーのうち、顎関節症での関与が示唆され、病変との関連について報告されているものは、①サイトカイン、②フリーラジカル、③アラキドン酸代謝産物、④タンパク分解酵素、⑤ニューロペプチドなどである。ここではサイトカインとフリーラジカルについて述べる。

① サイトカイン

サイトカインは糖タンパクであり、特異的レセプターと結合することで、きわめて微量でその機能を発現し、同時に互いに相乗的、相加的に、ときに拮抗的に作用する。炎症性関節疾患においては、炎症性サイトカインで

あるインターロイキン (IL) 1, IL-6, IL-8, 腫瘍壊死因子 (TNF α), インターフェロン γ (IFN- γ), などは滑膜炎、パンスの形成、軟骨マトリックスの破壊に重要な役割をもつと考えられている¹⁶⁾。IL-1は単球・マクロファージが産生するサイトカインネットワークの中心になる重要なサイトカインである。マクロファージ以外にも生体のさまざまな細胞から産生され、異物侵入や組織破壊に対してその情報を免疫系、中枢神経系、内分泌系、骨格系などに伝え、生体の恒常性維持に重要な役割を示す¹⁷⁾。滑膜細胞や軟骨細胞からも産生され、関節に対しては、Type II コラーゲンの合成を抑制する一方 Type I コラーゲンの合成を促進し、線維芽細胞のPGE₂とコラゲナーゼの産生を促進する¹⁸⁾。さらに他の炎症性サイトカインであるIL-6, TNF α , IL-8の産生を促進する。IL-1と同様、TNF α も主としてマクロファージから産生され、IL-1と同様の作用をもつサイトカインであり、滑膜細胞の増殖、コラゲナーゼおよびPGE₂の産生、軟骨のプロテオグリカンの合成抑制などに関与する¹⁹⁾。IL-6はB細胞増殖因子として発見され、CRPなど急性期タンパクの誘導、T細胞の活性化などの役割をもつ。滑膜細胞や軟骨細胞ではIL-1やTNF α により誘導されて産生される。これらのサイトカインは互いに絡み合って複雑なサイトカインネットワークを形成しているものと考えられる。近年、顎関節の滑液解析により、顎関節内障や変形性顎関節症の患者の滑液から、これらの炎症性サイトカインが高頻度に検出されることが明らかになり、病態との関連が注目されている。これらの炎症性サイトカインの顎関節滑液での報告は、1994年、Shafer ら²⁰⁾ のTNF α が最初である。以後様々なサイトカインについて、臨床症状との関連が検討されている。われわれは²¹⁾ 顎関節内障ならびに変形性顎関節症患者の滑液中のIL-1 β , TNF α , IL-6, IL-8, インターフェロン (IFN) γ (IFN γ) を健康人と比較し、健康人ではいずれも検出限界であることを、患者群ではいずれのサイトカインも検出されることを示した²¹⁾。Kubota ら²²⁾ はクローズドロック患者の滑液中のIL-1濃度が健康人に比較して有意に上昇していること、IL-1 β 濃度は下顎頭の変形との間に関連が認められることを示した。さらに Alstergren ら²³⁾ は、同様に、IL-1 β が顎関節痛と、骨格性開咬との間に関連があるとした。われわれの結果でも、IL-1 β の検出と顎関節痛の間には関連があることがわかった²¹⁾。さらに顎関節鏡視所見との比較において、IL-1 β の検出される関節は全例関節痛を有し、その多くは著明な滑膜炎を有し、軟骨のOA様変

化を伴っていることが示された²⁴⁾。これらの結果から顎関節内障や変形性顎関節症患者の顎関節局所において、IL-1 が関節破壊や滑膜炎の炎症に関与し、臨床的には顎関節痛にも関連することが明らかとなった。Shafer らは TNF α が顎関節の痛みと関連があり、さらに顎関節鏡視下手術など、外科手術の予後との関連を示した。Nordahl ら²⁵⁾ は、全身的に結合組織病変をもつ患者での開口時痛と、顎関節後方の痛みとの関連を示した。Kubota ら²⁶⁾ は、X 線上での下顎頭の OA 変化の有無と IL-6 濃度との関連を示した。Sandler ら²⁷⁾ は顎関節鏡視所見との比較検討で、滑膜炎の程度と IL-6 濃度の関連を示した。その他のサイトカインについては報告が少なく、臨床所見との関連については不明である。

フリーラジカル

フリーラジカルは“不対電子を1つまたはそれ以上有する分子、原子”と定義される²⁸⁾。活性酸素やフリーラジカルは一般に不安定で反応性に富み、時に生理的であるが、時に生体に障害を与え、生体にとってその重要性が注目されている。McCord²⁸⁾ は RA 患者の滑液の粘性は低下しており、同様の粘性の低下が滑液やヒアルロン酸溶液を活性酸素 O₂⁻ で処理した時にみられることより、活性酸素が炎症性関節疾患において重要な役割をもつことを示した。以来フリーラジカルは軟骨基質の破壊や滑液粘性の低下に重要な役割を持つことが明らかになりつつある²⁹⁾。Milam ら³⁰⁾ は変形性顎関節症の成因について、顎関節における機械的負担荷重が、“Oxidative stress”として、関節内の障害を与えるフリーラジカルの蓄積を促進し、その結果軟骨マトリックスの破壊につながるという仮説を提唱した。その1つのプロセスとして彼らは“虚血一再灌流現象 (Hypoxia-reperfusion)”を挙げている。顎関節における“Hypoxia-reperfusion”とは、咀嚼筋の異常な緊張によりブラキシズムやクレンチングが起きると、顎関節に負担荷重がかかり、顎関節内は一時的な低酸素・虚血状態になる。その後筋緊張が解けて、再灌流がおきると、活性酸素などのフリーラジカルが産生されるというものである。Nitzan ら³⁾ は、安静時とクレンチング時の顎関節腔内圧を測定し、“Hypoxia-reperfusion”が顎関節で起きうることを示し、フリーラジカル産生の可能性を指摘した。

近年、窒素酸化物の1つで血管弛緩物質であり、種々の生体反応に重要な役割を示すフリーラジカルの1つ、一酸化窒素 (Nitric oxide, 以下 NO) の関節疾患における役割が注目されている³²⁾。NO は RA や OA 患者の膝

などの滑液中や血清などに検出され³³⁾、炎症性関節炎の滑膜細胞や軟骨細胞からは多量の NO が産生され、実験的関節モデルでは NO のインヒビターにより滑膜炎と組織破壊が抑制される³⁴⁾ことから、炎症性関節疾患の滑膜炎や軟骨マトリックスの破壊に重要な役割を示すことが明らかになってきた。そこでわれわれは顎関節内障ならびに変形性顎関節症患者の滑液中の NO 量を測定するため、nitrite 量を測定し、健康人に比較して顎関節症患者で nitrite 量が有意に上昇していることをみいだした³⁵⁾。特に OA 患者ではその平均値が、Farrell ら³³⁾ の報告した膝 OA 患者の nitrite 量と同等であった。また興味深いことに、滑液中の IL-1 濃度と NO 濃度の間には強い正の相関が認められた³⁶⁾。さらに顎関節鏡視所見および顎関節痛の有無と滑液中の NO 濃度について比較検討した結果、顎関節痛を有する関節の NO 濃度は顎関節痛のない関節に比較して有意に高値を示した³⁷⁾。さらに関節鏡視所見との比較では、軟骨の OA 変化を示す関節では NO 濃度は有意に高値を示した。これらの結果より、顎関節症患者の軟骨の OA 変化や滑膜炎などの病態形成に NO が重要な役割を担っていることが示唆された。さらに NO の産生に IL-1 β などの炎症性サイトカインが関与していることも示唆された。

NO は生体内では一酸化窒素合成酵素 (nitric oxide synthase: NOS) の働きで、L-アルギニンより合成される。NOS には、構成型 (constitutive NOS: cNOS) と誘導型 (inducible NOS: iNOS) の2種類があり、炎症局所においては、NO は IL-1 などの炎症性サイトカインにより、iNOS の働きにより大量に産生されることが知られている。前述のように IL-1 β は顎関節滑液中に検出されること、さらに顎関節滑液中の IL-1 β 濃度と NO 濃度は正の強い相関が認められることより、NO は顎関節の滑膜や軟骨組織において iNOS の働きにより産生されているものと考えられる。そこで顎関節滑膜での iNOS の発現を、免疫組織化学的によって検索した結果、滑膜炎の無いコントロールの滑膜表層には iNOS の発現はみられなかったが、滑膜炎のある顎関節滑膜の表層には強い iNOS の発現が認められた^{38, 39)}。iNOS の発現は線維芽細胞様の細胞 (おそらく滑膜 B 細胞) にも認められたが、マクロファージ様の滑膜 A 細胞で特に強く認められ、これらの細胞はまた CD68 抗原陽性であることが示された。これらの結果より、少なくとも滑膜炎を有する顎関節滑膜においては iNOS の働きにより NO が産生されていることが示された。

フリーラジカルによるヒアルロン酸の分解

顎関節において、滑膜 B 細胞が産生するヒアルロン酸は、滑膜の主成分として、その潤滑に深くかかわっている。Nitzan ら⁴⁰⁾ は、“Oxidative stress” すなわちフリーラジカルは潤滑を担うヒアルロン酸を分解し、ヒアルロン酸の分解が顎関節の潤滑を障害させるとした。関節局所においてはヒアルロン酸の分解は主としてフリーラジカルが担っているとされており、本仮説は顎関節においても当てはまる可能性がある。

顎関節症患者にみとめられるヒアルロン酸の分子量の低下

われわれは、顎関節症患者の滑液中に NO が存在すること、それが臨床症状と関連あることを見出したことは先に述べた。そこでわれわれは顎関節症患者では関節内で産生された NO が“Oxidative stress”として働き、潤滑を担うヒアルロン酸を分解しているのではないかと仮説を立てた。そこで健常者と顎関節症患者の滑液中のヒアルロン酸の分子量を測定したところ、健常者ではヒアルロン酸の分子量はすべて測定限界以上の 3000 kDa 以上であったが、顎関節症患者とくにクローズドロックや変形性顎関節症では 90 % 以上の患者でヒアルロン酸の分子量の低下が認められた (図)。このことから顎関節症患者は NO などのフリーラジカルにより、滑液中のヒアルロン酸は分解されており、このことがこれらの患者の顎関節の機能障害に関与していることが示唆された⁴¹⁾。

図1 顎関節症患者にみられるヒアルロン酸の分子量の低下。
顎関節内障および変形性顎関節症患者の滑液中のヒアルロン酸の分子量を HPLC にて測定した。文献⁴¹⁾より引用。
CONTROL: コントロール群, DDC: 顎関節内障クリック群,
DDL: 顎関節内障ロック群, OA: 変形性顎関節症患者群
** $P < 0.01$

低分子ヒアルロン酸による破骨細胞の活性化

ヒアルロン酸は潤滑として、biochemical な作用をもつだけでなく細胞シグナル伝達を会した細胞生物学的作用をもつことが報告されている。当教室の大学院生の有吉らは、顎関節におけるヒアルロン酸の分子量低下の細胞生物学的意義の解明のため、in vitro での破骨細胞分化および骨吸収に対する様々な分子量のヒアルロン酸の影響について検討を行っている。その結果、マウス探求系細胞 RAW264.7 細胞を破骨細胞分化因子 (RANKL) 刺激下では、分子量 8 kD 以下の低分子ヒアルロン酸は破骨細胞の著明な活性化促進作用を有するが、高分子量のヒアルロン酸では破骨細胞の活性化促進作用を持たないことが示され、顎関節症患者のヒアルロン酸分子量の低下が顎関節部の骨代謝に関与する可能性が示され、その詳細なメカニズムについて現在解析中である。

顎関節滑液中の細胞からの破骨細胞の誘導

当教室の高野ら^{42,43)}は、これまでリウマチ患者からの滑膜細胞や滑液中細胞から破骨細胞を誘導を行ってきたが、顎関節症の関節変形や関節破壊における破骨細胞存在とその役割を明らかにする目的で、われわれは顎関節症患者から回収された滑液中の細胞から破骨細胞の誘導を試みている。これらの細胞は多核で、TRAP 陽性で、リン酸カルシウム焼結ディスク、象牙切片上での吸収窩形成をもつことから破骨細胞であることが確認された。このように顎関節滑液中には破骨細胞用細胞へ分化能を有する細胞が存在することが明らかとなり、顎関節疾患の病態形成に関与しうる可能性が示唆される。

おわりに

顎関節は小関節であり、生化学的、細胞生物学的研究は技術的に極めて困難であり、これらの手法を用いた顎関節疾患の病態解明は他の関節に比較して遅れていた。しかしこれら顎関節の細胞と細胞外マトリックスを用いた研究は、顎関節症の診断、予後の判定、治療法の決定、さらに治療としてサイトカインやフリーラジカルの産生抑制の臨床応用につながるものとして大いに期待できるものと考えられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、総説をまとめる機会を与えて下さった九州歯科学会の皆様に感謝申し上げます。また本研究の遂行に協力いただいた日大松戸歯学部口腔外科学

講座教授, 近藤寿郎先生, 秋田大学医学部歯科口腔外科, 福田雅幸先生, 永井宏和先生, 関 宏先生, 大貫敬嘉先生に深謝いたします。またヒアルロン酸の研究を一緒に行っている九州歯科大学口腔外科学第1講座助教授, 富永和宏先生に深謝いたします。なお本研究の一部は平成7年度文部省科学研究補助金基盤研究C(2)(課題番号: 07838005), 平成10年度文部省科学研究補助金基盤研究C(2)(課題番号: 10671863)の交付を受けたことを付記します。

引用文献

- 1) De Bond, L., Liem, R. and Boering, G.: Ultrastructure of the articular cartilage of the temporomandibular condyle: Aging and degeneration. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 60: 631-641, 1985.
- 2) Leonore, C. D., Lambert, G. M., DeBont, L. G. and Greet, B.: The structure, biochemistry, and metabolism of osteoarthritic cartilage. A review of the literature. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 53: 1182-1192, 1995.
- 3) Aghabeigi, B., Henderson, B., Hopper, C. and Harris, M.: Temporomandibular joint synovial fluid analysis. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* 31: 15-20, 1993.
- 4) Israel, H.A.: Synovial fluid analysis. *Oral Maxillofac. Surg. Clin. Nor. Amer.* 1: 85-92, 1989.
- 5) 大西正俊: 顎関節の関節鏡的検査法. *口病誌* 42: 207-213, 1975
- 6) McCain, J. P., Sanders, B., Koslin, M. G., Quinn, J. D., Peters, P. B. and Indresano, T.: Temporomandibular joint arthroscopy: a 6-year multicenter retrospective study of 4,831 joints. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 50: 926-930, 1992.
- 7) Sanders, B.: Arthroscopic surgery of the temporomandibular joint: treatment of internal derangement with persistent closed lock. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 62: 361-372, 1986.
- 8) Kaminishi, R. and Davis, C.L.: Temporomandibular joint arthroscopic observations of superior space adhesions. *Oral Maxillofac. Surg. Clin. Nor. Amer.* 1: 103-109, 1989.
- 9) Quinn, J. H.: Pathologies of temporomandibular joint chondromalacia and arthralgia. *Oral Maxillofac. Surg. Clin. Nor. Amer.* 1: 47-57, 1989.
- 10) Murakami, K-I., Segami, N., Fujimura, K. and Iizuka, T.: Correlation between pain and synovitis in patients with internal derangement of the temporomandibular joint. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 49: 1159-1161, 1991.
- 11) Smith, A. J., Basu, M. K., Speculand, B., Kassem, M. A. and Lloyd, J. M.: Synovial fluid glycosaminoglycan (acid mucopolysaccharide) analysis in assessment of temporomandibular joint dysfunction. A pilot study. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* 27: 853-861, 1989.
- 12) Israel, H. A., Saed-Najad, F. and Ratcliffe, A.: Early diagnosis of osteoarthritis of the temporomandibular joint: correlation between arthroscopic diagnosis and keratan sulfate levels in the synovial fluid. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 49: 708-711, 1991.
- 13) Okazaki, J., Kakudo, K., Kamada, A., Utoh, E., Gonda, Y., Shirasu, R. and Sasaki, T.: Chondroitin sulfate isomers in synovial fluid of healthy and diseased human temporomandibular joints. *Eur. J. Oral Sci.* 105: 440-443, 1997.
- 14) Shibata, T., Murakami, K-I., Kubota, E. and Maeda, H.: Glycosaminoglycan components in temporomandibular joint synovial fluid as markers of joint pathology. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 56: 209-213, 1998.
- 15) Murakami, K-I., Shibata, T., Kubota, E. and Maeda, H.: Intra-articular levels of prostaglandin E₂, hyaluronic acid, and chondroitin-4 and -6 sulfates in temporomandibular joint synovial fluid of patients with internal derangement. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 56: 199-203, 1998.
- 16) Arend, W. P. and Dayer, J-M: Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 33: 305-315, 1990.
- 17) 高橋 哲, 鈴木隆二, 熊谷勝男: インターロイキン1と免疫系. *日本臨床* 45: 978-987, 1987.
- 18) Dayer, J-M., de Rochemonteix, B., Demczuk, S. and Dinarello, C. A.: Human recombinant interleukin 1 stimulates collagenase and prostaglandin E₂ production by human synovial cells. *J. Clin. Invest.* 77: 645-648, 1986.
- 19) Hopkins, S. J. and Meager, A.: Cytokines in synovial fluid: II. The presence of tumor necrosis factor and interferon. *Clin. Exp. Immunol.* 73: 88-92, 1988.
- 20) Shafer, D. M., Assael, L., White, L. B. and Rossmanno, E. F.: Tumor necrosis factor- α as a biochemical marker of pain and outcome in temporomandibular joint with internal derangements. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 52: 786-791, 1994.
- 21) Takahashi, T., Kondoh, T., Fukuda, M., Yamazaki, Y., Toyosaki, T. and Suzuki, R.: Proinflammatory cytokines detectable in synovial fluids from patients with temporomandibular disorders. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 85: 135-141, 1998.
- 22) Kubota, E., Imamura, H., Kubota, T., Shibata, T. and Murakami, K.: Interleukin 1 beta and stromelysin (MMP3) activity of synovial fluid as possible markers of osteoarthritis in the temporomandibular joint. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 55: 20-27, 1997.

- 23) Alstergren, P., Ernberg, M., Kvarnstrom, M. and Kopp, S.: Interleukin-1 beta in synovial fluid from the arthritic temporomandibular joint and its relation to pain, mobility, and anterior open bite. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 56: 1059-1065, 1998.
- 24) 高橋 哲, 大谷真紀, 福田雅幸, 近藤寿郎: 顎関節鏡視診断と顎関節滑液中の炎症性メディエーターの比較検討. *関節鏡* 25: 127-131, 2000.
- 25) Nordahl, S., Alstergren, P. and Kopp, S.: Tumor necrosis factor- α in synovial fluid and plasma from patients with chronic connective tissue disease and its relation to temporomandibular joint pain. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 58: 525-530, 2000.
- 26) Kubota, E., Kubota, T., Matumoto, J., Shibata, T. and Murakami, K-I.: Synovial fluid cytokines and proteinases as markers of temporomandibular joint disease. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 56: 192-198, 1998.
- 27) Sandler, N. A., Buckley, M. J., Cillo, J. E., and Braun, T. W.: Correlation of inflammatory cytokines with arthroscopic findings in patients with temporomandibular joint internal derangements. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 56: 534-543, 1998.
- 28) McCord, J. M.: Free radicals and inflammation. *Science* 185: 529-531, 1974.
- 29) Halliwell, B.: Oxygen radicals, nitric oxide and human inflammatory joint disease. *Ann. Rheum. Dis.* 54: 505-510, 1995.
- 30) Milam, S. B. and Schmitz, J. P.: Molecular biology of temporomandibular joint disorders: proposed mechanisms of disease. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 53: 1443-1454, 1995.
- 31) Nitzan, D. W.: Intra-articular pressure in the functioning human TMJ and its alteration by uniform elevation of the occlusal plane. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 52: 671-679, 1994.
- 32) Stefanovic-Racic, M., Stadler, J. and Evans, C. H.: Nitric oxide and arthritis. *Arthritis Rheum.* 36: 1036-1044, 1993.
- 33) Farrell, A. J., Blake, D. R., Palmer, R. M. and Moncada, S.: Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. *Ann. Rheum. Dis.* 51: 1219-1222, 1992.
- 34) McCartney-Francis, N., Allen, J. B., Mizel D. E., Albina, J. E., Xie, Q. W., Nathan, C. F. and Wahl, S. M.: Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* 178: 749-754, 1993.
- 35) Takahashi, T., Kondoh, T., Kamei, K., Seki, H., Fukuda, M. and Yamazaki, Y.: Elevated levels of nitric oxide in synovial fluid from patients with temporomandibular disorders. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 82: 505-509, 1996.
- 36) 高橋 哲, 福田雅幸, 永井宏和, 高野 浩, 本間英孝, 大谷真紀: 顎関節の滑液解析: 顎関節症患者からの Nitric Oxide と インターロイキン 1β の検出. *東北大学歯誌* 17: 92-99, 1998.
- 37) Takahashi, T., Kondoh, T., Ohtani, M., Homma, H. and Fukuda, M.: Association between arthroscopic diagnosis of temporomandibular joint osteoarthritis and synovial fluid nitric oxide levels. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 88: 129-136, 1999.
- 38) Homma, H., Takahashi, T., Seki, H., Ohtani, M., Kondoh, T. and Fukuda, M.: Immunohistochemical localization of inducible nitric oxide synthase in synovial tissue of human temporomandibular joints with internal derangement. *Arch. Oral Biol.* 46: 93-97, 2001.
- 39) Takahashi, T., Homma, H., Nagai, H., Seki, H., Kondoh, T., Yamazaki, Y. and Fukuda, M.: Specific expression of inducible nitric oxide synthase in the synovium of the diseased temporomandibular joint. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 95: 174-181, 2003.
- 40) Nitzan, D. W.: The process of lubrication impairment and its involvement in temporomandibular joint disc displacement: a theoretical concept. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 59: 36-45, 2001.
- 41) Takahashi, T., Tominaga, K., Takano, H., Ariyoshi, W., Habu, M., Fukuda, J. and Maeda, H.: A decrease in the molecular weight of hyaluronic acid in synovial fluid from patients with temporomandibular disorders. *J. Oral Pathol. Med.*, in press, 2003.
- 42) Toyosaki-Maeda, T., Takano, H., Tsuruta, Y., Maeda-Tanimura, M., Shimaoka, Y., Takahashi, T., Itoh, T., Suzuki, R. and Ochi, T.: Differentiation of monocytes into multinucleated giant bone-resorbing cells: two-step differentiation induced by nurse-like cells and cytokines. *Arthritis Research* 3: 306-310, 2001.
- 43) Takano, H., Tomita, T., Toyosaki-Maeda, M., Takeuchi, E., Kaneko, M., Shi, K., Takahi, K., Myoui, A., Takahashi, T., Suzuki, R., *et al.*: Comparison of the activities of multinucleated bone-resorbing giant cells derived from CD14-positive cells in synovial fluid of rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. *Rheumatology*, in press, 2003.