

原	著
---	---

顎関節の構造と機能に関わる基質成分

小 林 淳 二

東京医科歯科大学歯学部口腔外科学第1講座（主任：天笠光雄教授）

東京医科歯科大学歯学部生化学講座（主任：佐々木 哲教授）

（1991年12月18日 受付）

Studies on Matrix Components Relevant to Structure and Function of the Temporomandibular Joint

Junji Kobayashi

First Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Faculty of Dentistry,
Tokyo Medical and Dental University

(Chief : Prof. Teruo Amagasa)

Department of Biochemistry, Faculty of Dentistry,
Tokyo Medical and Dental University

(Chief : Prof. Satoshi Sasaki)

Proteoglycans (PGs), or their component glycosaminoglycan (GAG) chains, have long been recognized as small in quantity but as significant components for many connective tissues. The temporomandibular joint (TMJ) disc and synovial fluid were rarely investigated in this regard. This research was aimed at the biochemical analysis of the composition of collagen, GAGs and PGs in the normal human and porcine TMJ discs, and of PGs in the synovial fluid.

1. The collagen type analysis by gel electrophoresis revealed that the human and porcine TMJ discs were composed only of type I collagen.

2. The human TMJ disc contained 69.9% chondroitin sulfate, 24.5% dermatan sulfate, 5.6% hyaluronic acid and a trace amount of keratan sulfate, and the porcine TMJ disc, 5.8%, 91.4%, 2.8% and a trace amount, respectively. Immunohistochemical staining of the functional parts of the TMJ disc showed a universal distribution of these GAGs.

3. PGs were extracted from the TMJ disc with 4 M guanidine chloride and separated by ion-exchange and gel-filtration chromatography. A high molecular weight PG resembling the cartilage PG and two low molecular weight PGs having a core protein of Mr 40 K were isolated.

4. PGs suggested to be derived from the matrix of other tissues were found in the abnormal human synovial fluid.

From these results it was suggested that the TMJ disc was thought not to be fibrocartilage but a fibrous tissue adapted against to the compressive and tensile force.

I. 緒 言

顎関節は咀嚼運動を司る自由度の高い運動、す

なわち左右調和を保った蝶番運動や前方滑走運動を行い、咀嚼時に生じる大きな咬合圧を歯および歯周組織とともに負担する生理機能を有する。

他の関節と比べて特異的な運動と負荷を担う顎関節は、その構成要素として種々の組織を含むが、なかでも関節円板およびその環境を構成する関節液は、関節運動や機能維持に重要な役割を果たしていると考えられる。

顎関節部の疾患としては、発育異常、外傷、炎症、腫瘍など多様な疾患が含まれるが、雑音、疼痛、機能障害を単独にまたは併発し、明確な炎症症状を示さない疾患は顎関節症と総称されている。顎関節症はその病態、症状により、Ⅰ型からⅣ型およびその他のものに分類され¹⁾、この中で、顎関節症Ⅲ型は関節円板に障害をきたすものの、またⅡ型、Ⅳ型は関節円板周辺の軟組織および骨性構成体に病変、変化が認められるものとされている。なかでもⅢ型、Ⅳ型をあわせると、顎関節症患者全体の半数以上を占めるまでになっている。

顎関節の正常顎運動および疾患時における病的变化の主体である関節円板およびその周囲組織に関して、組織学的、機能的検索が古くから行われ、さらに関節造影法を含むX線撮影法やMRIなどの進歩により、正常および疾患時における形態学的構造や機能変化について追求、調査されてきた^{2~4)}。しかしながら、機能や病態の相互の生理的機能変化を組織の基質変化として捉える研究はあまりなされていない。

これまで、関節円板は線維軟骨の板状物とされ、無機成分の構造や含有量に関する報告はなく、むしろ有機成分としてのコラーゲンや非コラーゲン性タンパクが主要構成成分として存在していることが報告されている⁵⁾。ウシ胎児の関節円板⁶⁾、ブタ関節円板⁷⁾を用いた報告によると、構成コラーゲンはⅠ型およびわずかにⅢ型を含むが、ヒト関節円板ではⅠ型であり、その架橋結合に関する研究もなされている⁷⁾。また、非コラーゲン性タンパクとして多く含まれるプロテオグリカン(PG)およびその糖鎖であるグリコサミノグリカン(GAG)に関して、古くはGranströmら⁸⁾による研究があり、ラット、ウサギ、イヌ、サル、関節円板にヒアルロン酸(HA)およびデ

ルマタン硫酸(DS)が同定され、量的にはDSを多く含むことが報告されている。また、Koppら⁹⁾は、組織学的手法を用いヒト関節円板におけるGAGの局在性について検索し、コンドロイチン硫酸(CS)あるいはDSが円板の中央部と前後部分では有意に分布に差があり、円板中央部に高濃度に局在すると報告している。さらに、Nakanoら^{10,11)}は、ウシ関節円板中に軟骨型に類似した高分子型PG、HA、低分子型DS-PGおよびわずかのケラタン硫酸(KS)が存在することを報告している。

一方、関節液に関しては、古くから整形外科領域において生化学的検索がなされており、その組成成分や変形性関節症、関節リウマチなど関節疾患との関わりについて詳しい報告があり、臨床応用もなされている^{12~14)}。顎関節の関節液に関する研究は、サルを用いた病的関節液のHAの量的、質的変動、およびヒト関節液含有タンパクに関して行われており、その中でサル病的関節液におけるHA濃度の低下とHAの低分子化¹⁵⁾、およびヒト病的関節液における総タンパク量の増加、分子量78Kタンパクの出現¹⁶⁾などが報告されている。

PGは関節円板においてはコラーゲンとともに、また関節液中では主要成分として微少環境をつくり、コラーゲン形成など細胞活性に重要な働きを有すると考えられている。PGの構造および生理的活性に関しては軟骨において詳細に研究されているが¹⁷⁾、この軟骨型PGと類似したPGが各種組織中から単離され、また同時に分子量の異なる数々のPGの存在が報告され^{18,19)}、その起源や生理的役割に関心がもたれている。しかしながら、ヒト顎関節の関節円板および関節液に含まれるPGに関する検索は十分とはいえず、両者の相互関係および疾患との関連についてもほとんど報告がない。

これらのことから本研究ではヒト関節円板および関節液中に含まれるPGの生化学的性状を明らかにするため、糖鎖成分およびコアプロテインについて検索を行い、咬合様式がヒトと類似してい

るとされる²⁰⁾ プタ関節円板 および 関節液と比較し、関節円板の生理的機能の相違および関節液における疾患時の変化について検討した。

II. 材料ならびに方法

1. 材 料

ヒト関節円板は剖検および手術摘出物より採取した。生前、術前に顎関節疾患の訴えないことが確認された年齢34歳から76歳（平均61.3歳）の男性2例、女性5例のものを正常関節円板として試料に用いた。また、生後約6カ月のブタ顎関節を屠殺場より入手し、肉眼的に異常の認められない関節円板を採取した。

関節液は協力が得られた41例を対象として、顎関節に異常を訴えない正常例男性6例、女性2例、および本学第1口腔外科にて臨床的に顎関節症と診断された18歳から54歳（平均34.2歳）までの男性10例、女性23例の関節液を用いた。また、ブタ関節液の試料として、屠殺場より入手した生後約6カ月のブタ顎関節5例のものをを用いた。

2. 方 法

1) 関節円板の調整ならびに抽出方法

関節円板は、中央部の機能的関節面に相当する部分を周囲組織より採取、生理的食塩水で洗浄後、液体窒素下で粉碎、粉末とした。この試料を生理的食塩水にて洗浄、遠心後（8,000 rpm, 20分）、沈渣は多糖成分の分析に用いた。

多糖成分は4 M 塩酸グアニジンを含む50 mM Tris-HCl 緩衝液（pH 7.4, 0.1 M 6-アミノカプロン酸, 5 mM 塩酸ベンザミジン, 1 mM フェニルメタンスルホンプロラドを含む）にて4℃, 72時間抽出し、30,000 × g, 20分遠心分離を行った。以後この抽出物を G-ext と呼ぶ。

2) 関節液の採取ならびに調整

ヒト関節液は上関節腔に対して2%キシロカイン2 ml による緩圧下でパンピングを3回行い、キシロカイン溶液に混入させた状態で回収し関節液試料とした。また、ブタ関節液の採取は、凍結したブタ顎関節の上関節腔を開放し凍結状態で存

在する関節液を回収した。

得られた関節液は不溶物および血球成分などを取り除く目的で、3,000 rpm, 10分遠心し、その上清を分析に用いた。

3) コラーゲンの型分析

4 M 塩酸グアニジン抽出後の遠心で得られた沈渣を用いて不溶性コラーゲンの型分析を行った。0.1 N 酢酸中で試料の1/10量のペプシン（Sigma）を用い、4℃, 24時間消化を行い100,000 × g, 60分遠心し、上清に最終濃度1.5 M となるようにNaClを加え、生じた沈澱を遠心分離し、水に対し透析、脱塩後凍結乾燥しペプシン可溶性コラーゲンとした^{21, 22)}。

型分析はSykesら²³⁾の方法を用いた。すなわち、0.1% SDSを含む5%ポリアクリルアミドゲル（0.5 × 10 cm, ディスク）と、0.1% SDS/100 mM Tris-borate（pH 8.6）緩衝液を用いた。試料は2% SDS/30%グリセロール/2 M 尿素/20 mM Tris-borate（pH 8.6）中で60℃, 30分熱変性したものをを用いた。電気泳動は、泳動開始後約1.2 cm 移動したところで、緩衝液を捨て10% 2-メルカプトエタノールをゲル上方に1時間作用させ還元を行った。還元終了後1本当たり1 mAにて泳動を行った。ゲルの染色は0.25%クマジーブリリアントブルーR-250（CBB）により20分染色後、ただちに脱色液（酢酸150 ml, メタノール100 ml/2 l）にて脱色した。

4) 関節円板の多糖成分の精製

関節円板のG-extを限外濾過（YM-5, 分子量5,000 cut-off, Amicon 社）にて濃縮したのち、7 M 尿素を含む50 mM Tris-HCl 緩衝液を濃縮後の容積の20倍加え、さらに20倍に濃縮する操作を3回行い繰り返し、緩衝液の交換を行った。

試料は、同じ緩衝液で平衡化したDEAE-Sep-hacel（2.5 × 12 cm）にかけ、0~1.0 M NaClの直線濃度勾配（全量500 ml）で0.5 ml/min の速度で溶出した。溶出液は280 nm の吸光度（日立分光光度計, 340型）を測定し、5 ml ずつ分画した。

多糖成分の確認には、カルバゾール硫酸法^{24, 25)}を用い、各画分のウロン酸量を測定し、この反応

に陽性を示す画分を多糖粗画分として得た。

多糖粗画分は4 M塩酸グアニジンを含む50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) で平衡化したカラム (Asahipak, GS-510, 旭化成工業) による分子篩高速クロマトグラフィー (Waters 社) を、流速 1.0 ml/min で行い、吸光度を 234 nm で測定した。そして各画分のウロン酸量も定量した。分子量標準としては、ケタラーゼ (240K), アルドラーゼ (158K), ウシ血清アルブミン (67K), キモトリプシノーゲン (25K) を用いた。

試料の精製過程における精製度は、0.1% SDS を含む 4-15% 濃度アクリルアミドゲルにて電気泳動を行い、CBB およびアルシアンブルー 8GS (ALB) にて染色し、確認した。

5) 糖鎖成分の抽出²⁶⁾

G-ext および精製画分に対して重量の 30 倍の 0.5 N NaOH 溶液を用い、4℃, 20 時間アルカリ処理を行ったのち、1 N 塩酸で中和した。試料にプロナーゼ消化用緩衝液 (50 mM Tris-HCl, 2.5 mM MgCl₂, pH 7.8) を同量加え、100℃, 30 分、熱変性したのち放冷した。プロナーゼ E (科研化学社) は消化開始時および 37℃, 24 時間インキュベートした後の 2 回、タンパク質量の 1/50 量ずつ添加した。反応に際し、防腐剤として少量のトルエンを加えた。消化 (48 時間) 後、4℃ に冷却してから 30% トリクロロ酢酸を半量加え、未消化およびプロナーゼを除去し、4℃, 1 時間放置した後 8,000 × g, 15 分遠心分離した。上清は PD-10 (Sephadex G-25M, Pharmacia) を用い、蒸留水にて脱塩後、凍結乾燥 (Dura-DRY™, FTS SYSTEM 社) を行い、糖鎖試料として用いた。

6) アセテート膜電気泳動²⁶⁾

糖鎖の同定はアセテート膜を用いた一次元電気泳動を行った。アセテート膜 (Separax-S, 常光産業) はあらかじめ 25% メタノール溶液、泳動用緩衝液に浸したものを用いた。試料は 0.3 M 酢酸カルシウム緩衝液にて、1.0 mA/cm で 3 時間泳動を行った。泳動後のアセテート膜は、0.1% ALB の 0.1% 酢酸溶液で 10 分間染色後、ただちに 0.1% 酢酸溶液で 20 分間脱色したのち乾燥した。

なお、標準糖質としては、HA, C4-S, C6-S, DS および KS (生化学工業) を用いた。

コンドロイチナーゼ ABC および AC II (生化学工業) による酵素消化試験により、同定の確認を行った。得られた糖鎖試料を、前者は 40 mM 酢酸ナトリウム, 0.01% BSA を含む 40 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 中で、後者は 40 mM 酢酸ナトリウム, 0.01% BSA を含む 40 mM 酢酸緩衝液 (pH 6.0) 中で、それぞれ 37℃, 2 時間消化したのち、同様の方法でアセテート膜電気泳動を行った。

染色した泳動像は画像処理装置 (TIB-100, イムノメディカ社) にて各画分の相対量を算出した。

7) コアプロテインの調整

関節円板より得られた PG 画分および関節液に対し、コンドロイチナーゼ ABC および AC II を用いてコアプロテインの抽出を行った。消化は上述の条件にて行い 8,000 × g, 30 分遠心後、上清と沈渣はそれぞれ脱塩、凍結乾燥した。

8) SDS 電気泳動 (SDS-PAGE)

試料は試料用緩衝液 (1% SDS, 10% グリセロール, 0.1% メルカプトエタノール, 1 mM EDTA, 6 M 尿素 および bromphenol blue を含む 10 mM Tris-HCl 緩衝液, pH 8.0) に溶解後、4℃, 24 時間 SDS 化し、Laemmli の方法²⁷⁾ に準じ電気泳動を行った。

0.1% SDS を含む 4-15% 濃度勾配により作成した SDS-ポリアクリルアミドゲルに試料を加えた後、50 mM Tris-glycine 緩衝液 (pH 8.3) にて泳動した。分子量の標準としては、ミオシン (200 K), E. coli β -ガラクトシダーゼ (116.3 K), ウサギ筋ホスホリラーゼ b (97.4 K), ウシ血清アルブミン (66.2 K), 卵アルブミン (45 K) が混合されたキット溶液 (SDS-PAGE Molecular Weight Standards, High and Low Range, Bio Rad 社) を用いた。

9) ウェスタンブロットによる検索

SDS-PAGE 後、Towbin らの方法²⁸⁾ によりウェスタンブロットを行った。ニトロセルロース膜

(pore size 0.45 μm , Bio Rad 社)を用い, 25 mM Tris-glycine/20%メタノール緩衝液 (pH 8.7) にて30V, 30分転写した後, 3%スキムミルクにて室温, 60分ブロッキングした。一次抗体には0.2% BSAを含むPBS緩衝液で1,000倍に希釈した抗PG-モノクローナル抗体1-B-5 ($\Delta\text{Di-0S}$), 2-B-6 ($\Delta\text{Di-4S}$), 3-B-3 ($\Delta\text{Di-6S}$), 5-D-4 (Anti-KS) (生化学工業)を用い, 4℃, 24時間反応させた。二次抗体による反応は0.2% BSA-PBSにて1,000倍に希釈したHRP結合ヤギ抗マウスIgG抗体 (Cappel 社) にて室温, 40分反応させ, 基質溶液 (PBS 25 ml, DAB 5 mg, H_2O_2 5 μl) にて発色させた。

10) 免疫組織学的検索

正常ヒトおよびブタ関節門板は前方肥厚体, 中央狭窄部, 後方肥厚体およびそれぞれを内外側に3分割した9部分に切り分けそれぞれO. C. T COMPOUND (Tissue-tek, Miles 社) に包埋, -80℃にて急速凍結した。クリオスタットにて約5 μm の凍結切片を作製後, ドライヤーにて30分風乾し, 4℃, 10分間アセトンにて固定した。PBS洗浄後, ブロッキングに先立ちコンドロイチナーゼ消化を行った。0.02 units コンドロイチナーゼ ABC/ml 消化用緩衝液中にて37℃, 2時間消化した後, PBSにて洗浄した。その後, 0.3% H_2O_2 メタノールを用い室温にて, 20分間内在性ペルオキシダーゼの除去を行った。さらに, 0.5%正常ヤギ血清を含むPBS中にて室温で, 20分ブロッキングした後, 上述した抗PGモノクローナル抗体4種類を1,000倍希釈し4℃, 24時間反応させた。PBS洗浄後, 二次抗体として0.2% BSA-PBSにて1,000倍に希釈したHRP結合ヤギ抗マウスIgG抗体を, 25℃, 40分反応させ, 基質溶液 (PBS 25 ml, DAB 5 mg, H_2O_2 5 μl) により発色させた。その後, ヘマトキシリンで核染色を行い, エタノール系列で脱水, キシロール透徹したのち, 封入, 検鏡を行った。

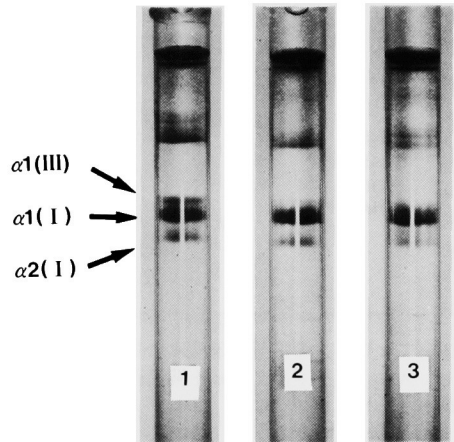


図1 ペプシン可溶性コラーゲンの途中還元ゲル電気泳動像 (6%ポリアクリルアミドゲル)

1: ブタ皮膚, 2: ブタアキレス腱, 3: ブタ関節門板

Ⅲ. 結 果

1. コラーゲンの型分析

ブタ関節門板の4M塩酸グアニジン抽出によって得られた不溶性コラーゲンからのペプシン可溶性コラーゲンと, 対照として用いたブタアキレス腱および皮膚コラーゲンの還元後の電気泳動パターンを図1に示す。I型コラーゲンのみで構成されるアキレス腱は, $\alpha 1(I)$, $\alpha 2(I)$ のバンドのみが認められた。皮膚では $\alpha 1(I)$, $\alpha 2(I)$ 鎖のほかに, III型コラーゲン由来の α 鎖が認められた。ブタ関節門板ではアキレス腱と同様に $\alpha 1(I)$, $\alpha 2(I)$ のバンドのみ認められ, これらのデンストメーターによる比率は2:1を示し, I型コラーゲン ($[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$) から構成されることが示された。

同様にヒト関節門板のコラーゲンにおいてもIII型コラーゲンは含まれず, I型コラーゲンのみで構成されていることが示された。

2. アセテート膜電気泳動法による GAG の分析

ヒトおよびブタ関節門板の G-ext から抽出した GAG の同定を行った (図2)。これらの結果を, 画像処理による分析から検討した結果 (表1), ヒト関節門板では CS が主成分で C6-S が

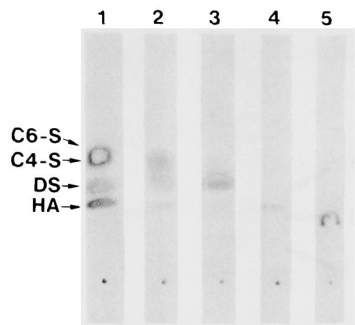


図2 アセテート膜電気泳動法による GAG の分析
1 : スタンダード, 2 : ヒト関節円板, 3 : ブタ
関節円板, 4 : ヒト関節液, 5 : ブタ関節液

表1 アセテート膜電気泳動像の画像処理装置で算出した相対量 (%)

アセテート膜電気泳動法では、関節円板において KS, 関節液において HA 以外の GAG は検出されなかった

1 : スタンダード	C 6 - S	C 4 - S	DS	HA
2 : ヒト関節円板	47.9	22.0	24.5	5.6
3 : ブタ関節円板	1.8	4.0	91.4	2.8
4 : ヒト関節液	——	——	100
5 : ブタ関節液	——	——	——	100

(%)

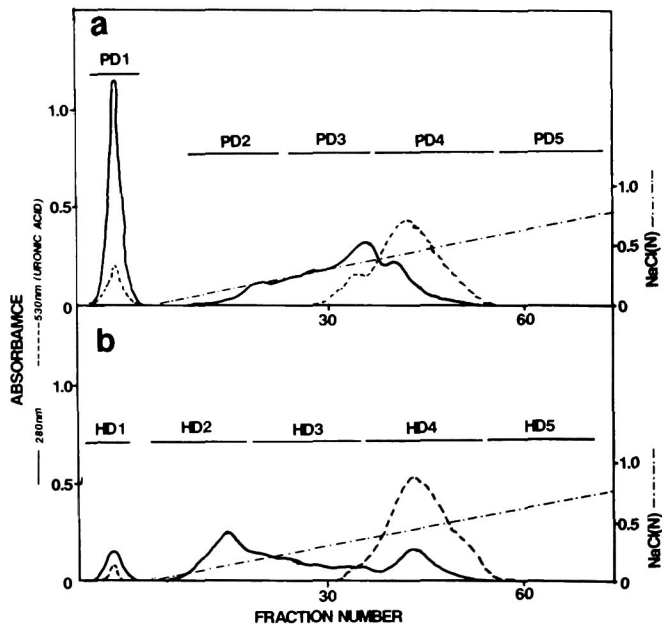


図3 ブタおよびヒト関節円板 G-ext の DEAE-Sephacel イオン交換クロマトグラム

a : ブタ関節円板, b : ヒト関節円板, — は 280 nm の吸収, はウロン酸, ····· は NaCl の濃度勾配を示す

47.9%, C4-S が22%で, DS は24.5%, および HA は5.6%であった。一方, ブタ関節円板では DS が主成分で91.4%を占め, CS は5.8%, HA は2.8%と少なかった。また, 関節液はヒト, ブタともに HA のみ認められ, 本分析方法では他の GAG は検出されなかった。

ここで示した 0.3M 酢酸カルシウム緩衝液による電気泳動のほか, ピリジン-ギ酸緩衝液による電気泳動も行い, 2 種類の泳動パターンから GAG の同定を行った。また, 抽出された GAG をコンドロイチナーゼ ABC およびコンドロイチナーゼ ACII により消化した後, 同様にアセテート膜電

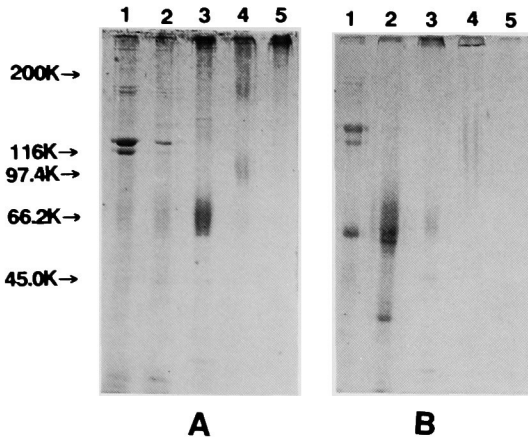


図4 プタおよびヒトの DEAE-Sephacel イオン交換クロマトグラムにおける各画分の4-15%ポリアクリルアミドゲルによる SDS 電気泳動パターン (CBB 染色)
A: プタ, B: ヒト, 1~5 はそれぞれ PD 1~5, HD 1~5 を示す

気泳動を行った結果, バンドの消失状況から上述の同定結果が確認された。

3. 各種クロマトグラフィーの結果

1) イオン交換クロマトグラフィー

図3にヒトおよびブタ関節円板の G-ext の DEAE-Sephacel イオン交換クロマトグラフィーの溶出パターンを示した。溶出画分のパターンはヒトとブタとでは若干異なっていたものの, 両者とも NaCl 濃度0.4~0.6Mの範囲でウロン酸のピークを認めた。NaCl 濃度0において溶出した非吸着成分は, ブタにおいて著明でヒトではわずかであった。DEAE-Sephacel の各画分はブタで PD 1~PD 5, ヒトで HD 1~HD 5 に分け, 各画分に含まれる成分を, SDS-PAGE により CBB および ALB 染色性から検討した (図4)。PD 1, 2 には主としてコラーゲン, PD 3 には血清アルブミン, PD 5 には分子量200K以上の高分子が含まれ, いずれも ALB 染色性は示さなかった。しかし, PD 4 の各バンドは ALB 強染色性を示し, PG を主成分とするものと考えられた。一方, HD 1 には同様にコラーゲン, HD 2, 3 には血清アルブミン, HD 5 にはわずかな高分子が含まれ, HD 4 は PD 4 同様の ALB に強染色性を示

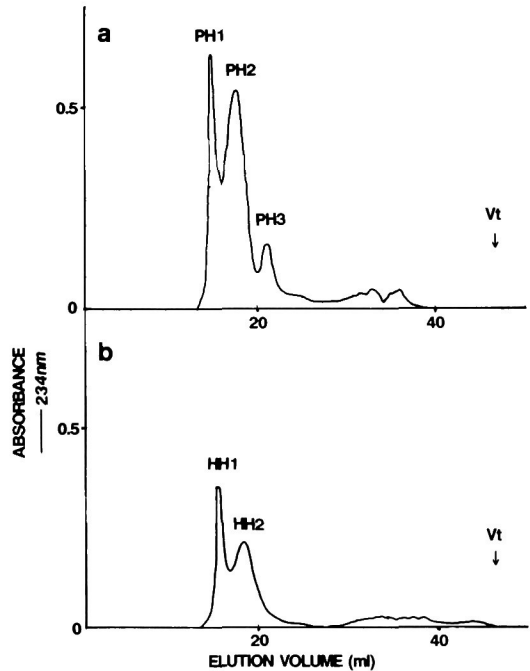


図5 PD 4 および HD 4 のゲル濾過 HPLC クロマトグラム (Asahipak)
a: PD 4, b: HD 4

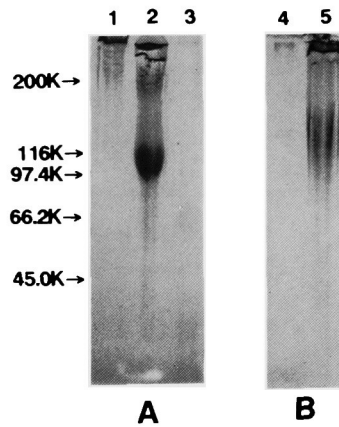


図6 ゲル濾過クロマトグラムの各ピークの4-15%ポリアクリルアミドによる SDS 電気泳動パターン (ALB 染色)
A: プタ, B: ヒト, 1: PH 1, 2: PH 2, 3: PH 3, 4: HH 1, 5: HH 2 を示す

し, PG の存在が認められた。

2) 高速ゲル濾過クロマトグラフィー

ヒトおよびブタ G-ext の DEAE-Sephacel に

より分離された PD 4 および HD 4 を, Asahipak (GS-510) を用いて HPLC で分画した (図 5)。ヒトにおいては主に二つ (HH 1, 2) の, ブタにおいては主に三つのピーク (PH 1, 2, 3) が溶出された。このうち PH 3 を除いた各画分の SDS-PAGE を ALB で染色した結果, いずれも染色陽性を示したため, PG を含む画分として分析に供した。分子量的には HH 1, PH 1 においてはゲル上端に, PH 2 では 200K, 100K に, HH 2 では 250K, 150K にそれぞれブロードなバンドとして認められた (図 6)。

4. ヒトおよびブタ関節円板 PG の分析

1) 一次元 SDS 電気泳動

コアプロテインについては, HPLC で得られた HH 1, 2 および PH 1, 2 をおのおのコンドロイチナーゼ ABC および AC II 消化後に, SDS 電気泳動を用いて検索した (図 7)。コンドロイチナーゼ ABC により CS, DS が, またコンドロイチナーゼ AC II により CS, HA がそれぞれ分解された結果, PG のコアプロテインが検出されるようになった。すなわち, HH 1, PH 1 ではコンドロイチナーゼ AC II によりゲル上方の高分子型 PG のバンドが消失し, 新たに分子量 400K, 360K の二つのバンドが出現したが, コンドロイチナーゼ ABC では高分子型 PG のバンドは

消失しなかった。また, PH 2 ではコンドロイチナーゼ ABC により分子量 200K および 100K のバンドが消失し, 分子量 40K に著明なバンドが, さらにコンドロイチナーゼ AC II により量的には少ないが同様に 40K にバンドが認められた。一方, HH 2 においてもほぼ同様の結果が認められ, 40K にブロードなバンドが認められた。

2) ウェスタンブロットによる検索

図 8 にコンドロイチナーゼ ABC 処理後の試料

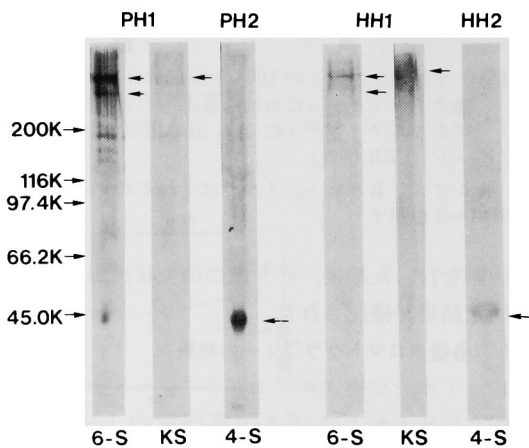


図 8 ブタおよびヒトの PG 分画のコンドロイチナーゼ ABC 消化物の SDS 電気泳動後の Immunoblotting

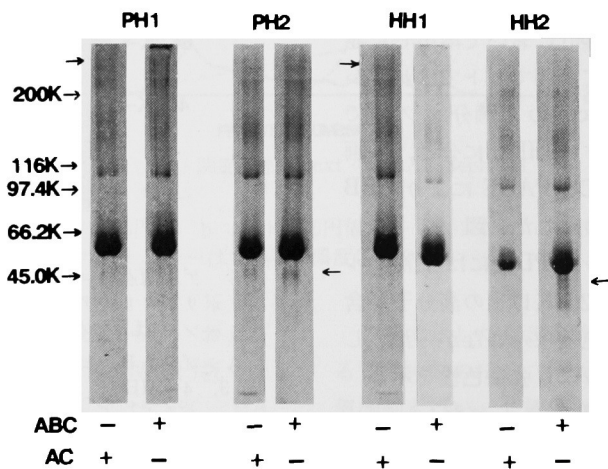


図 7 ブタ および ヒトの PG 分画の コンドロイチナーゼ ABC および AC II 消化物の SDS 電気泳動像

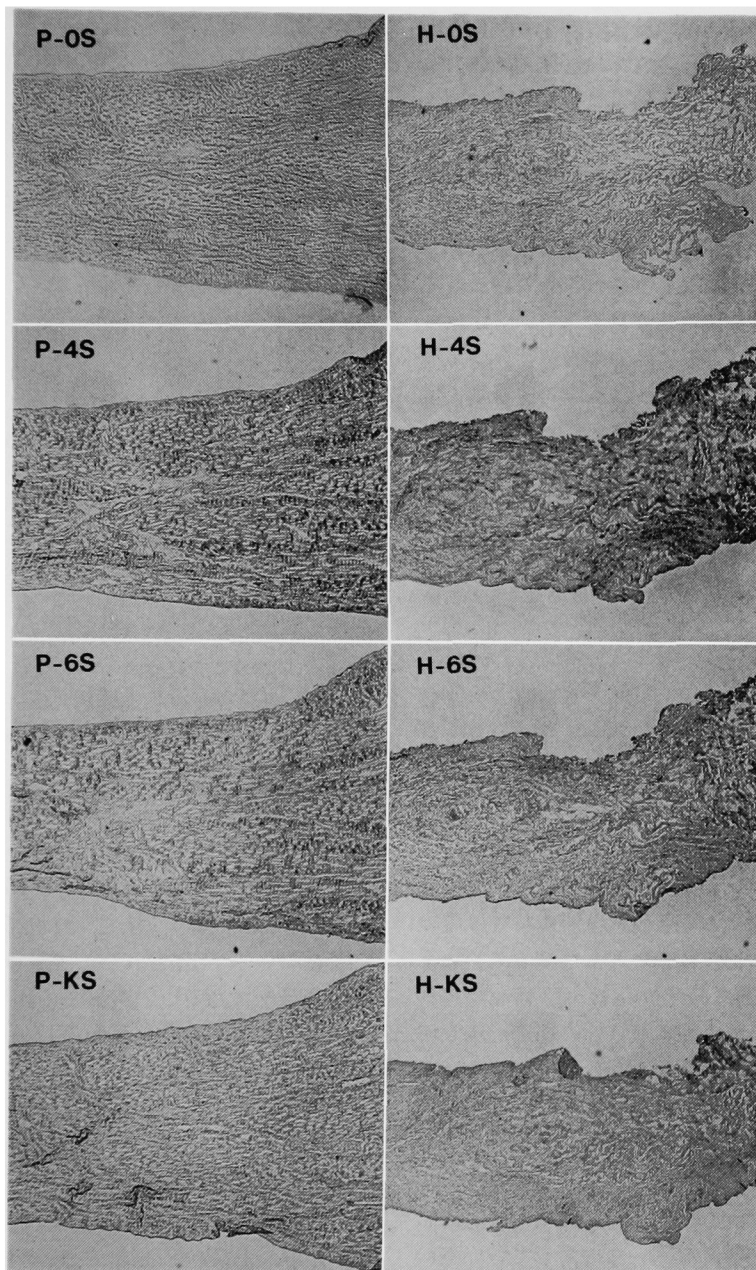


図9 PAP 法によるヒトおよびブタ関節円板の免疫染色像

Pはブタ関節円板の中央狭窄部，Hはヒト関節円板の前方肥厚体の像で，
0S，4S，6S，KSはそれぞれ抗体の種類を表す

に対して、モノクローナル抗体 2-B-6 (Di-4S), 3-B-3 (Di-6S), 5-D-4 (Anti-KS) を用いてウェスタンブロットを行った結果を示す。コンドロイチナーゼ消化後に出現したバンドの分布に一致して抗体と反応する陽性の像を示した。抗体 3-B-3 に対して、ヒト、ブタともに認められた 400K, 360K の二つのバンドが反応したが、400K のバンドが著明であった。また、ブタにおいて 40K のバンドが弱い反応性を示した。一方、2-B-6 に対しては、ヒト、ブタともに 40K のバンドが強い反応性を示した。また、ブタにおいて 100K 付近のバンドが反応陽性を示したが、コンドロイチナーゼ AC II 消化後の試料では反応陰性であったことから、DS が主に関与していることが示唆された。さらに、KS に対する抗体ではヒト、ブタともにわずかながら 400K のバンドが反応陽性を示した。

5. 免疫組織学的検索

正常ヒトおよびブタ関節円板を 9 分割し、それぞれの部位から作製した凍結切片をコンドロイチナーゼ ABC および AC II 処理した後、モノクローナル抗体 1-B-5, 2-B-6, 3-B-3, 5-D-4 を用いて PAP 法により免疫染色を行った (図 9)。まず、部位による染色性に関しては前後、内外各部位において特に分布の特性は認められず、いずれの部位においてもコラーゲン線維に沿って広い範囲にわたる陽性反応が認められた。また、各抗体に対する反応性の相違に関しては、ブタ、ヒトともに抗体 1-B-5 に対しては円板全域について陰性であったのに対し、ブタにおいて抗体 2-B-6 に対し強い陽性反応が認められ、やや染色性が弱いものの抗体 3-B-3, 5-D-4 に対しても陽性であった。一方、ヒトにおいては抗体 2-B-6, 3-B-3 に対して強い陽性反応が認められ、5-D-4 についても陽性で、これらの結果はアセテート膜電気泳動を用いて行った GAG の固定結果と一致していた。以上より、正常ブタ、ヒト関節円板において、硫酸化多糖鎖成分の分布に関しては局在性はないものと考えられた。

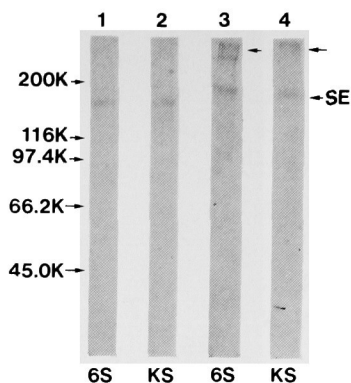


図10 正常および病的ヒト関節液のコンドロイチナーゼ ABC 消化物の泳動後の Immunoblotting

1, 2: 正常, 3, 4: 病的関節液

1, 3は6硫酸抗体, 2, 4はKS抗体に対する反応像を示す。SEは血清においても反応がみられた。また、ブタ関節液はいずれの抗体に対しても反応しなかった

6. 関節液について

ヒト関節液の遠心上清を7.5~20% SDS電気泳動により検索したところ、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、アルブミンが主要成分であった。ALB染色によりゲル上端の高分子領域に染色陽性のバンドがともに認められたが、すでに示したように関節液から抽出した糖鎖成分をアセテート膜電気泳動で検索した結果ではHAのみ検出されたことから、このバンドは主にHAであることが示唆された。

さらに、このようなHA以外の糖鎖関連タンパクについて検索するため、正常ブタおよび正常、病的ヒト関節液をコンドロイチナーゼABCで処理した後、ウェスタンブロットを行い同じ抗体を用いて免疫学的に検索を行った (図10)。正常ブタ関節液においては免疫反応が認められなかったが、正常ヒト関節液では正常ヒト血清と類似した反応性を示した。一方、ヒト病的関節液においては分子量 400K のバンドが抗体 3-B-3, 5-D-4 で認識され、ヒト病的関節液中に C6-S および KS 関連タンパクが存在することが示された。このバンドは分子量的に関節円板において PG のコアプロテインとして認識された 400K の

バンドと一致していた。

IV. 考 察

1. コラーゲンの型分析について

関節円板を用いたコラーゲンの型分析に関する研究として、鹿島⁷⁾はヒトおよびブタ関節円板はⅠ型コラーゲンより構成されることを示したが、CNBr 処理後の分析ではブタ関節円板はⅠ型コラーゲンのほかにわずかなⅢ型コラーゲンを含むことを報告している。また Hirschmann ら⁶⁾は、ウシ胎児の関節円板はⅠ型コラーゲンおよび滑膜由来と考えられるごく少量のⅢ型コラーゲンで構成されると報告している。さらに、Milan³¹⁾らは、Ⅰ型およびⅡ型コラーゲンに対するモノクローナル抗体を用いヒヒ (*Papio cynocephalus*) の関節円板を免疫組織学的に検索したところ、Ⅱ型コラーゲンは認められずⅠ型コラーゲンのみ存在したことを報告している。本研究において、正常ブタおよびヒト関節円板のペプシン可溶性コラーゲンを用いた電気泳動では、ブタ、ヒトともに $\alpha 1$ (Ⅲ) の存在が認められず、関節円板は $[\alpha 1$ (Ⅰ)]₂ $\alpha 2$ (Ⅰ) 鎖よりなるⅠ型コラーゲンで構成されることが示された。Burgeson³⁰⁾によると、滑膜の構成コラーゲンはⅠ型コラーゲンが主体でⅢ型コラーゲンも含まれるが、Ⅲ型コラーゲンのほとんどは滑膜中の血管組織に由来するものとしている。今回、関節円板周囲組織および滑膜の混入を避けるため可及的に機能的関節面のみ採取し分析に用いたが、その一部の組織切片を観察したところ、周囲組織および滑膜の混入は避けられていた。しかし、年齢6カ月のブタの円板組織中にはわずかながら血管組織が入り込んでいる像が認められた。したがって、Ⅲ型コラーゲンの存在が関節円板組織本来のものと考えることには問題があるものと思われた。これらのことから関節円板の構成コラーゲンはヒト、ブタともにⅠ型コラーゲンであると考えられた。

組織の構成コラーゲンの型分布に関してはこれまで多くの報告がされている。軟組織においては、血管がⅠ、Ⅲ、Ⅳ型、皮膚がⅠ、Ⅲ型、腱が

Ⅰ型コラーゲンから構成され、硬組織である骨がⅠ、Ⅲ型、硝子軟骨がその特徴であるⅡ型コラーゲンから構成されている。一方、線維軟骨とされるヒト椎間板のコラーゲンは外層線維輪を除いた部分ではⅡ型コラーゲンのみで、外層においてはⅠ、Ⅱ型コラーゲンが混在している³²⁾。また、ヒト膝関節半月板の構成コラーゲンはⅠ型コラーゲンのみとされている³³⁾。これらと今回のコラーゲンの型分析から、顎関節の関節円板はⅠ型コラーゲンのみから構成されている腱および膝関節半月板と類似していることが示された。

2. 関節円板に含まれる GAG について

コラーゲン種の分析より関節円板は膝関節半月板および腱組織と類似していることが示されたが、機能的にもこれらには多くの類似点がみられる。顎関節の関節円板は咀嚼時に発生する下顎頭および側頭骨からの咬合圧と外側翼突筋および後部組織による張力とを担う組織であり³⁴⁾、また膝関節半月板は主に荷重負担により関節機能の維持を行い³⁵⁾、腱組織は骨と筋組織の連結部でそれぞれ張力と荷重負担を担っている³⁶⁾。このような組織中においては、主たる構成成分であるコラーゲンとともに、多糖成分がその生理機能の一部を担うと考えられ¹⁹⁾、生理機能の負担の程度により含有多糖成分の比率に差異がみられる^{11, 37~39)}。膝関節半月板における GAG に関しては多くの報告があり、イヌ半月板では CS が 85%、HA が 10%、DS が 5% 認められ⁴⁰⁾、ヒト半月板では外側と内側で多少異なるものの全体として CS が 54%、HA が 13%、DS が 19%、KS が 14% 認められる⁴¹⁾。また、腱組織においては、機能的に二つの部位に分けられ、それぞれにおいて組成が異なっている⁴²⁾。ウサギ腱の張力に抵抗する部位においては DS が 45%、CS が 22%、HA が 33% 認められ、荷重負担を受ける部位においては DS が 20%、CS が 58%、HA が 22% 認められる³⁶⁾。一方、Granström ら⁸⁾は、サル、ウサギ、イヌの顎関節の関節円板は DS が主成分で他に HA が含まれ、ラットでは HA が優位であるとしている。また、Kopp ら⁹⁾は、組織学的染色法を用いてヒ

ト関節円板中に HA, CS あるいは DS, KS が存在することを示したが、これらの比率についての報告はない。最近、Nakano ら⁴³⁾の報告では、ウシ関節円板には CS が79%, DS が14%, HA が5%, KS が2%含まれるとしており、免疫染色を用いた Mills ら⁴⁴⁾のウサギ関節円板における結果と類似している。このように、組織において組織固有の機能が関与して GAG に相違がみられることは、腱組織の細胞培養による GAG の合成能についての報告からも示されており⁴⁵⁾、荷重負担部位においては CS, KS が関与し³⁷⁾、張力に抵抗する部位においてはコラーゲンの線維形成に関係する DS が関与している^{11, 38, 39)}と考えられている。

今回、ブタおよびヒト顎関節の関節円板においてはともに DS, CS, HA ならびに KS が同定された。アセテート膜電気泳動の ALB 染色から、主成分としてブタでは DS が91%, ヒトでは CS が70%, DS が24.5%存在し、ともに HA, KS はわずかであることが認められた。これらの結果より、荷重負担、張力抵抗に関連した機能的特性を表現すると考えられる DS/CS 値について比較すると、ヒト関節円板の DS/CS 値は0.35を示し、これは腱の荷重負担部位およびヒト膝関節半月板のものとほぼ一致していた。しかしながら、ヒト関節円板は DS, CS とともにこれらよりも高比率に含有しており、機能的に荷重ならびに張力の両者に対応するための特性をもった組織であると同時に、他の組織に比べ両者の力がより強力、複雑に作用しているものと考えられる。事実、ヒト関節円板は下顎頭の周囲では内外側極に強固に付着し⁴⁶⁾、筋の張力を伝達することで外側翼突筋の収縮時に下顎頭を関節隆起後斜面におしあて安定化させる作用があり⁴⁷⁾、この際に関節円板における張力抵抗および荷重負担の機能が関与しているものと考えられる。一方、ブタ関節円板は他の組織と比べても大きな相違が認められた。すなわち、DS/CS 値は15.7を示し、腱の張力抵抗部位の値(2.1)よりも大きく、多くの DS を含有していた。この要因として、ブタの咀嚼系の機能は

ヒトと類似しているものの²⁰⁾、関節円板に加わる作用としてヒトとは異なる円板滑走あるいは強い張力抵抗機能が関与していることが考えられた。その他に考えられる相違の要因として、動物種による相違⁴⁸⁾、加齢変化による相違^{49, 50)}があげられる。しかしながら、ヒトおよびブタ関節円板の GAG についての分析報告はなく、本研究でも6カ月のブタとヒト(高齢者)とを直接比較できないため、この点に関しては今後の検索が必要と考える。

3. 関節円板に含まれる PG について

4 M塩酸グアニジン抽出液を用いた PG の抽出において、分離精製過程での緩衝液の選択により種々の分子形態、会合状態の PG を分離することができる⁵¹⁾。今回、正常ブタおよびヒト関節円板から PG を抽出、分離する過程において、塩酸グアニジンおよび7 M尿素を用いた非会合条件下で行った。

おのおのの G-ext のイオン交換クロマトグラフィーによりウロン酸を含むタンパクが NaCl 濃度0.4~0.6Mにおいて溶出されたが、このパターンは腱⁵²⁾、骨⁵³⁾、関節軟骨⁵⁴⁾およびウシ顎関節の関節円板¹⁰⁾とほぼ一致していた。この画分は、ゲル濾過クロマトグラフィー(HPLC)により、二つの画分に分離された。

PG はそのコアプロテインの分子量の大きさにより large PG (PG-L) と small PG (PG-Sm) と呼ばれる二つのグループに分けられている。PG-L には HA と会合体を形成するものとししないものがあるが、会合体を形成するものは軟骨をはじめ、動脈、血管内皮、腱、膝関節半月板で見い出されている^{17, 19, 52, 54~56)}。軟骨においてはさらに結合する KS の量および分子量の差により三つの PG-L が分離されている⁵⁴⁾。また、ウシ顎関節の関節円板においてもコアプロテインの分子量が450Kと352Kの二つの PG-L が認められている¹⁰⁾。今回ヒトおよびブタ関節円板に認められた高分子型 PG は、酵素消化実験で HA との結合が示され、またコアプロテインと考えられる400K, 360Kの二つのバンドは C6-S および KS と

の関連が示されたことから、軟骨型の PG-L に類似するものであると考えられた。

一方、PG-Sm に関して、Fisher ら⁵⁷⁾はウシ骨に二つの PG-Sm を認め、これらは45Kのコアプロテインの一つないしは二つの分子量40KのCSを糖鎖としてもつことを示した。さらに、PG I (biglycan), PGII (decorin) が関節軟骨に見い出され⁵⁸⁾、同様の PG-Sm が他の組織においても分離されるようになった^{19, 55)}。腱においては、その荷重負担部位で PG I, PG II がともに認められ、張力抵抗部位では主に PG II が認められ PG I はわずかである⁶⁶⁾。また、膝関節半月板においても、DSを多く含む PG-Sm が見い出されている⁵⁶⁾。今回のブタおよびヒト関節円板からも、同様に二つの PG-Sm が認められたが、コアプロテインのサイズ、GAGの組成および分子量から、250, 200Kの PG-Sm が PG I, 150, 100Kの PG-Sm が PG II に相当するものと考えられた。分子量的には骨の PG よりは小さく、軟骨、腱の PG と類似しており、コアプロテインの分子量は約40Kで、骨、軟骨型よりも大きく、腱型のものとはほぼ類似していた。また、SDS-PAGE により検索したところ GAG の分子量は約40~60Kで、これは骨のものより大きく、腱型のものと類似していた。これらのことから、ヒトおよびブタ関節円板の2種類の PG I, PG II は腱型の PG と類似し、40Kのコアプロテインに1本または2本の GAG が結合した分子形態をしているものと推定された。

ところで、GAGの組成に関しては、ヒトの PG-Sm のコアプロテインは C4, 6-S, HA を消化するコンドロイチナーゼ AC II では現れず、C4, 6-S, DS を消化するコンドロイチナーゼ ABC により出現し、抗体 2-B-6 により認識されたことから、糖鎖として DS をもつことが示唆された。これに対しブタの PG-Sm はコンドロイチナーゼ AC II, ABC により消化され、そのコアプロテインは抗体 2-B-6 に強く認識され、わずかに抗体 3-B-3 によっても認識された。今回用いた各抗体がコアプロテイン側の2糖の構造を

認識する^{59~61)}ことと、本研究において GAG のアセテート膜電気泳動で、ヒト、ブタともに泳動パターンにブロードなスポットが認められたことから、その糖鎖は DS-CS のハイブリッド型として存在することが示唆された。同様に Habuchi ら⁶²⁾はヒト膝関節半月板において多種の DS-CS のハイブリッド型 GAG が存在すると報告しており、また皮膚、滑膜の線維芽細胞から分泌される PG-Sm においてもハイブリッド型の糖鎖の存在が示されている⁶³⁾。今回のブタの GAG のほとんどが DS で、含まれる CS の割合はわずかであり、ヒトの GAG とは組成が異なるものであったが、GAG 鎖内における DS および CS の組成は組織特性に関連して変化がみられるものと考えられた。

このような PG は、その糖鎖である GAG においても認められたように、組織の機能的特性に関与している。軟骨型 PG-L は、HA との結合と保水機能により機能的性状を担い、軟骨において典型的な作用である荷重負担を担うと考えられる。一方、PG-Sm の機能的な役割として、PG II はコラーゲン線維に結合し線維形成に対して障害作用をもつことから⁶⁴⁾、コラーゲン線維の形成と会合の調整を行い、張力に抵抗する能力を調整しているものと考えられる。また、PG I の生理学的機能は今のところ不明であるが、結合組織の特異的な細胞の周囲に局在することが報告されており⁶⁵⁾、おそらく細胞活性の調整を行っていると考えられる。今回、ヒトおよびブタ関節円板中に認められた PG-L, PG I, PG II の含有比率は、ヒトにおいて38%, 7.6%, 54.6%で、ブタにおいて34%, 21.7%, 44.3%であった。このことから、関節円板は豊富なコラーゲンを有する組織でありながら PG-L を多く含み、腱の張力に抵抗する部位とは異なり大きな荷重負担を生理的に受けていると考えられた。また、ヒト関節円板は PG II とコラーゲンとの相互作用により張力に抵抗している一方で、円板中に含まれる線維芽細胞が PG I による影響を受けて、軟骨型 PG-L を含む基質成分の調整が行われ、特異的な機能に対応す

る能力を賦与される可能性も示唆される。一方、ブタ関節円板には PG I がかなり認められたが、GAG の組成が特徴的であったことは、関節円板の機能的特性、成熟度を反映しているものと考えられた。

これら PG, コラーゲン種および GAG の検討から、関節円板は腱においてはその荷重負担部位に酷似しており、また、器官としても共通する膝関節半月板に類似していることが示された。

4. 関節円板における GAG の局在性について

今回同定された GAG の局在性を検索するため、機能的関節面に相当する部分を 9 分割した後、免疫染色を行った。C4-S と DS の識別のためにコンドロイチナーゼ ABC およびコンドロイチナーゼ AC II で処理した染色切片の比較を行った。

その結果、正常ブタ関節円板においては部位による局在性は認められず、生化学的分析結果と類似した染色性が得られ、機能的関節円板全域に多量の DS およびわずかの CS, KS が存在することが示された。また、正常ヒト関節円板においてもブタと同様局在性は認められず、関節円板全域に主に C4-S が存在し、同程度の C4-S と DS, わずかの KS が存在することが示された。ヒト関節円板における GAG の分布を組織学的手法である CEC 法を用いて検索した報告においては、円板を前後的に 4 分割し最前部から A, C_A, C_P, P として、メタクロマジー発現を基準として HA および CS あるいは DS が C_A+C_P において A+P よりも有意に多く認められたとしている⁹⁾。また、ウシ関節円板を CS と DS に対する抗体およびサフラニン O を用いて染色した結果によると、サフラニン O により円板中央部がより濃染され、この部位に CS が多く存在すると考えられたが、抗体染色により関節円板が CS 抗体に対してほぼ均一に染色され、DS 抗体に対しては円板前後部組織が強陽性で、DS は円板中央部よりも周囲組織に多く存在するとしている⁴³⁾。いずれの場合も GAG が関節円板および周囲組織において局在性をもつとされている。しかし、本検索に用いた部

位は、前者の報告における C_A+C_P および A の後方部位に相当しており、この部位では CEC 法においても有意差は認められておらず、また、後者においては抗体で均一に染色された部位に相当しており、前後円板付着部は含まれていない。したがって本検索の結果は両報告と一致するものであり、機能的関節面相当部においては、GAG は均一に分布するものと考えられた。

一方、ウサギ関節円板に抗体を用いて検索した結果では⁴⁴⁾、KS はコラーゲン線維に沿って広範囲に存在したが、CS は軟骨様細胞周囲の細胞間質に多く認められ、これはヒトの関節円板においても同様とされている³¹⁾。本研究では関節円板中に軟骨様細胞はみられず、このような所見は認められなかった。一般に、正常ブタおよびヒト顎関節円板には軟骨様細胞は認められないが⁶⁶⁾、老化あるいは機能要求の変化に対応して代謝活性が低下した領域に存在する線維芽細胞が化生変化を起こし、軟骨様細胞が出現することが考えられるので⁴⁷⁾、今後これらの組織に対する詳しい検索が必要と思われる。

5. 関節液中の多糖成分について

関節液の組成は基本的には血漿濾過液であり、これに滑膜から分泌される HA-タンパク複合体であるムチンが加わったもので⁶⁷⁾、関節運動を潤滑にし、また関節軟骨に栄養を供給している。したがって、主な成分は血漿由来のアルブミンと多糖成分としての HA であると考えられるが、本研究における正常ヒトおよびブタ関節液の SDS-PAGE およびアセテート膜電気泳動の結果から、これら成分が主要なものとして存在することが示された。一方、膝関節の関節液において、リウマチや変形性関節症に関連して含有 PG の研究がなされ、関節軟骨由来と考えられる PG が病的関節液に見い出されている⁶⁸⁾。したがって、関節円板や関節軟骨に変性をきたす顎関節症においても、同様に関節液にこれらの成分が現れるものと推察される。そこで、正常ヒトおよびブタ関節液ならびに病的ヒト関節液に含まれると考えられる微量の PG の同定を行うために、コンドロイチナーゼ

ABC 消化後, 上述した 各種抗体を用いて検索を行ったところ, 正常ブタ関節液中には抗体に反応する成分は認められなかったが, 正常ヒト関節液では対照として用いたヒト血清と類似した PG の存在が認められた。この成分が正常関節液の基本的構成成分と考えることもできるが, 正常ブタ関節液には血清類似の PG はみられないこと, 滑膜における血液関節関門により分子量の大きなタンパクの血液から関節内移動は制限されることなどから, 正常ヒト関節液における血清類似の PG の存在は採取時の刺入に際して血液混入により影響されたものと考えられる。一方, 病的ヒト関節液においては, この PG 成分以外に 6 硫酸および KS を認識する抗体により分子量400K のタンパク成分の存在が示され, これは免疫学的, 分子量的に関節円板中に認められた軟骨型 PG と類似していた。膝関節において, Witter ら⁶⁹⁾は, 軟骨型 PG の HA 結合部位, KS およびコアプロテインを認識する抗体を用いて変形性関節症およびリウマチ患者の関節液を検索した結果, これらの成分が関節液中に認められたことを報告している。また, 顎関節の関節液に関して, Israel ら⁷⁰⁾は, 変形性顎関節症患者において KS 量が増加することを報告している。これらの関節軟骨に変性をきたす疾患においては, 関節液中に認められるこれらの PG は軟骨成分の破壊あるいは変性により出現するものと考えられるが, 今回は顎関節症と診断された症例で, 多様な病態の関節液を混合したものをを用いたため, 同定された PG がいかなる病態で見い出されるかは明らかではない。しかし, その性状から組織由来のものと考えられ, 特に, 関節円板中にも見い出された軟骨型 PG と類似していることから, 疾患時には顎関節の関節液においても, 病態との関連が示唆される組織由来の PG が検出されることが明らかとなった。

この PG に関与すると考えられる GAG は, アセテート膜電気泳動では認められず, 関節液中の多糖成分としては HA のみ同定された。これは, 疾患時における関節液の変化を検索した他の報告¹⁵⁾と一致している。しかし, 膝関節の関節液の

GAG 量は急性関節炎において増加が認められ, 慢性関節炎においては認められないが⁷¹⁾, PG のフラグメントは慢性時の関節液においても有意に増加が認められる⁷²⁾。このことから, 急性症状により組織から由来した PG の GAG は, 治癒あるいは慢性化の過程で分解, 代謝され, そのコアプロテインの一部が関節液中に残存しているものと考えられる。顎関節症の多くは慢性的経過をたどる場合が多く, 関節液中に HA 以外の PG あるいは GAG の出現がみられても, アセテート膜電気泳動では同定されないほどに微量となることが考えられる。この点, 今回 PG の残存が認められたことは, 疾患やその程度を探るうえで, 今後, 有用な手法になることが期待される。

V. 結 論

正常ヒトおよびブタ顎関節の関節円板のコラーゲンおよびプロテオグリカンに関して生化学的, 免疫組織学的に検索し, その基質成分の特徴について比較検討した。さらに, 正常ヒトおよびブタ顎関節の関節液, ならびに病的ヒト関節液の多糖成分に関して生化学的に分析し, ヒト関節液における病態変化について検討した。

1. 正常ヒトおよびブタ関節円板のコラーゲンは, I 型コラーゲンのみで構成されていた。
2. 正常ヒトおよびブタ関節円板中に含まれるグリコサミノグリカンは, ヒト関節円板ではコンドロイチン硫酸が主成分で69.9%を占め, 24.5%のデルマトン硫酸が認められたほかに, わずかのヒアルロン酸, ケラタン硫酸が認められた。ブタ関節円板ではデルマトン硫酸が主成分で91.4%を占め, コンドロイチン硫酸は5.8%と少なく, ヒアルロン酸, ケラタン硫酸はわずかであった。
3. 正常ヒトおよびブタ関節円板において, 主に3種類のプロテオグリカンが認められた。ヒアルロン酸との会合体を形成する高分子型のプロテオグリカン, および分子量が異なる2種類の低分子型プロテオグリカンであった。これらの含有比率は, ヒトで38%, 7.6%, 54.6%, ブタでは34%, 21.7%, 44.3%であった。

4. モノクローナル抗体を用いた免疫学的検索の結果、高分子型のプロテオグリカンは糖鎖としてコンドロイチン 6-硫酸を有し、さらにコアプロテインの分子量が400K, 360Kの2種類認められ、ヒアルロン酸との会合が示され、軟骨型のプロテオグリカンと類似するものであった。低分子型プロテオグリカンは、約40Kのコアプロテインを有し、糖鎖としてはヒトでは主にデルマトン硫酸で分子量40~60K、ブタではデルマトン硫酸とコンドロイチン硫酸がハイブリッド型を呈して結合しているものと推定された。これらは、コアプロテインに糖鎖が一または二つ結合した分子形態で存在していると考えられ、他の組織中でも認められている PG I (biglycan), PG II (decorin) と類似するものであった。

5. 正常ヒトおよびブタ関節円板の機能的関節面に相当する部分を免疫組織学的に検索した結果、各グリコサミノグリカンはいずれも局在性を認めず、均一に分布していることが示された。

6. 関節液中の多糖成分について SDS 電気泳動のアルシアンブルー染色およびアセテート膜電気泳動による検索の結果、ヒアルロン酸のみが認められた。抗体を用いた免疫学的検索の結果、正常ブタ関節液中には他のプロテオグリカンは認められなかった。また、病的ヒト関節液中には正常関節液および血清中には認められない6硫酸化糖鎖が結合するプロテオグリカンが認められた。このプロテオグリカンは分子量的、免疫学的に関節円板中に認められた軟骨型の高分子プロテオグリカンと類似していたことから、疾患時において関節液中に微量で、糖鎖が短小化された組織由来のプロテオグリカンが出現する可能性が示唆された。

以上より、関節円板はその基質成分（コラーゲン、プロテオグリカン）の特徴から、靱組織および膝関節半月板と類似した線維性組織であるが、Ⅱ型コラーゲンが含まれないことから、これらとともに線維軟骨として分類されていることは適当でないと考えられた。また、関節円板中に認められたコラーゲンと個々のプロテオグリカンの生理

作用の特徴から、負荷関節と考えられている顎関節において、関節円板は荷重負担および張力抵抗の作用を担っていることが示された。

謝 辞

稿を終えるに当たり、懇篤なるご指導、ご校閲を賜りました本学塩田重利名誉教授、口腔外科学第1講座天笠光雄教授、ならびに歯学部生化学講座佐々木哲教授に謹んで感謝の意を表します。また、直接懇切なるご指導、ご助言を賜りました本学生化学講座高木亨講師、口腔外科学第1講座木野孔司博士に心から感謝の意を表します。さらに、多くのご助言、ご協力をいただきました口腔外科学第1講座、生化学講座の皆様にも厚くお礼申し上げます。

なお、本論文の一部は、第45回日本口腔科学会総会（1991年5月16日、京都）、第4回日本顎関節学会総会（1991年7月12日、名古屋）、第33回歯科基礎医学会総会（1991年10月9日、鹿児島）において発表した。

文 献

- 1) 小野尊陸, 岡 達, 金田敏郎, 三谷春保, 高須 淳, 高田和彰, 上村修三郎, 柴田考典, 田口 望 (顎関節症に関する小委員会) : 顎関節疾患および顎関節症の分類案, 第7回顎関節研究会誌 : 135-136, 1986.
- 2) Farrar, W. B. and McCarty, W. L. : Inferior joint space arthrography and characteristics of condyle paths in internal derangements of the TMJ. *J. Prosth. Dent.* 41 : 548-555, 1970.
- 3) Westesson, P. L. : Double-contrast arthrography and internal derangement of the temporomandibular joint. *Swed. Dent. J. [Suppl]* : 13, 1982.
- 4) Chung, H., Kino, K., Kobayashi, J. and Shioda, S. : Magnetic resonance imaging of the normal and abnormal temporomandibular joint. *J. Korean Acad. Oral Maxillofac. Surg.* 14(1) : 183-191, 1988.
- 5) 久保木芳徳, 藤沢隆一 : 顎関節の生化学. 顎関節の臨床 (歯界展望, 別冊) : 85-91, 1989.
- 6) Hirschmann, P. N. and Shuttleworth, C. A. : The collagen composition of the mandibular joint of the calf. *Archs. Oral Biol.* 21 : 771-773, 1976.
- 7) 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(3) : 424-437, 1988.
- 8) Granström, G. and Linde, A. : Glycosaminoglycans of temporomandibular articular discs. *Scand. J. Res.* 81 : 462-466, 1973.

- 9) Kopp, S. : Topographical distribution of sulphated glycosaminoglycans in human temporomandibular joint disks. *J. Oral Path.* 5 : 265-276, 1976.
- 10) Nakano, T. and Scott, P. G. : Proteoglycans of the articular disc of the bovine temporomandibular joint, I. High molecular weight chondroitin sulphate proteoglycan. *Matrix* 9 : 277-283, 1989.
- 11) Scott, P. G., Nakano, T., Dodd, C. M., Pringle, G. and Kuc, I. M. : Proteoglycans of the articular disc of the bovine temporomandibular joint, II. Low molecular weight dermatan sulphate proteoglycan. *Matrix* 9 : 284-292, 1989.
- 12) 荒井三千雄 : 関節液常用検査とその臨床的意義. *関節外科* 8(5) : 51-59, 1989.
- 13) 清水富男, 広畑和志 : 関節液の一般検査. *関節外科* 8(5) : 61-66, 1989.
- 14) 藤井克之 : 関節液の生化学的検査. *関節外科* 8(5) : 91-94, 1989.
- 15) 荒木春美 : 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. *日口外誌* 35(5) : 35-46, 1989.
- 16) 鄭 勲 : ヒト顎関節液の分析と顎関節症の臨床診断について一顎関節液中のタンパク質成分と症状の関係について一. *日口外誌* 35(1) : 86-96, 1989.
- 17) Herring, G. M. : The chemical structure of tendon, cartilage, dentin, and bone matrix. *Clin. Orthop.* 60 : 261-299, 1968.
- 18) Schwarz, K., Breuer, B. and Kresse, H. : Biosynthesis and properties of a further member of the small chondroitin/dermatan sulfate proteoglycan family. *J. Biol. Chem.* 265 : 22023-22028, 1990.
- 19) Poole, A. R. : Proteoglycans in health and disease, structures and functions. *Biochem. J.* 236 : 1-14, 1986.
- 20) Strom, D., Holm, S., Clemensson, E., Haraldson, T. and Carlsson, G. E. : Gross anatomy of the mandibular joint and masticatory muscle in the domestic pig (SUS SCROFA). *Archs. Oral Biol.* 11 : 763-768, 1986.
- 21) Miller, E. J. : Structural studies on cartilage collagen employing limited cleavage and solubilization with pepsin. *Biochemistry* 11 : 4903-4909, 1972.
- 22) Endy, C. and Edward, J. M. : Collagen polymorphism. *Science* 183 : 1200-1201, 1974.
- 23) Sykes, B., Puddle, B., Francis, M. and Smith, R. : The estimation of two collagens from human dermis by interrupted gel electrophoresis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72 : 1472-1480, 1976.
- 24) Bitter, T. and Muir, H. M. : A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal. Biochem.* 4 : 330-334, 1962.
- 25) 瀬野伸子, 川合由美子, 阿武喜美子 : 3. 定量実験法 (ムコ多糖実験法 I). 東京, 1972, 南江堂, 85-125.
- 26) 畑 隆一郎 : 酸性ムコ多糖の微量分析法. *蛋白質 核酸 酵素* 18 : 853-857, 1973.
- 27) Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head and Bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680-685, 1970.
- 28) Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. : Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets, Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 : 4350-4354, 1979.
- 29) Davison, P. F. : Tendon. Weiss, J. B. and Jayson, M. I. V. ed., *Collagen in Health and Disease*. Edinburgh London Melbourne and New York, 1982, Churchill Livingstone, 498-505.
- 30) Burgeson, R. : Articular cartilage, intervertebral disc, synovia. Weiss, J. B. and Jayson, M. I. V. ed., *Collagen in Health and Disease*. Edinburgh London Melbourne and New York, 1982, Churchill Livingstone, 335-361.
- 31) Milan, S. B., Klebe, R. J., Triplett, R. G. and Herbert, D. : Characterization of the extracellular matrix of the primate temporomandibular joint. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 49 : 381-391, 1991.
- 32) 辻 陽雄, 石井 勉, 本江 卓, 平野典和 : 椎間板の構築と変性. *脊椎脊髄 ジャーナル* 3 (3) : 192-196, 1990.
- 33) 遠藤裕幸, 軽部俊二, 益田峰男, 林 泰史, 五十嵐三都男 : ヒト関節軟骨および膝半月コラーゲンの加齢と疾患における生化学的研究. *日整会誌* 55 : 17-30, 1981.
- 34) Osborn, J. W. : The disc of the human temporomandibular joint, design, function and failure. *J. Oral Rehabilitation* 12 : 279-293, 1985.
- 35) McNicol, D. and Roughley, P. J. : Extraction and characterization of proteoglycan from human meniscus. *Biochem. J.* 185 : 705-713, 1980.
- 36) Gillard, G. C., Merrilees, M. J., Bell-Booth, P. G., Relly, H. C. and Flint, M. H. : The proteoglycan content and the axial periodicity of collagen in tendon. *Biochem. J.* 163 : 145-151, 1977.
- 37) Kempson, G. E., Muir, H., Swanson, S. A. V.

- and Freeman, M. A. R. : Correlations between stiffness and the chemical constituents of cartilage on the human femoral head. *Biochem. Biophys. Acta.* 215 : 70-77, 1970.
- 38) Scott, J. E. : Proteoglycan-fibrillar collagen interactions. *Biochem. J.* 252 : 313-323, 1988.
 - 39) Scott, J. E., Haigh, M., Nusgens, B. and Lapiere, C. M. : Proteoglycan, Collagen interaction in dermatosparatic skin and tendon. An electron histochemical study using cupromeronic blue in a critical electrolyte concentration method. *Matrix* 9 : 437-442, 1989.
 - 40) Adams, M. E. and Muir, H. : The glycosaminoglycans of canine menisci. *Biochim. J.* 197 : 385-389, 1981.
 - 41) Adams, M. E. and Ho, Y. A. : Localization of glycosaminoglycans in human and canine menisci and their attachment. *Conn. Tiss. Res.* 16 : 269-279, 1987.
 - 42) Gillard, G. C., Relly, H. C., Bell-Booth, P. G. and Flint, M. H. : The influence of mechanical forces on the glycosaminoglycan content of the rabbit flexor digitorum profundus tendon. *Conn. Tiss. Res.* 7 : 37-36, 1979.
 - 43) Nakano, T. and Scott, P. G. : A quantitative chemical study of glycosaminoglycans in the articular disc of the bovine temporomandibular joint. *Archs. Oral Biol.* 34(9) : 749-757, 1989.
 - 44) Mills, D. K., Daniel, J. C. and Scapino, R. : Histological feature and in-vitro proteoglycan synthesis in the rabbit craniomandibular joint disc. *Archs. Oral Biol.* 33(3) : 195-202, 1988.
 - 45) Daniel, J. C. and Mills, D. K. : Proteoglycan synthesis by cell culture from regions of the rabbit flexor tendon. *Conn. Tiss. Res.* 17 : 215-230, 1988.
 - 46) 木野孔司, 大村欣章, 黒川悦郎, 塩田重利 : 円板後部結合組織における二層部 (Bilaminar zone) の再検討—第一報 顎関節円板構成線維と下顎頭および周囲構造との関係—。日顎誌 1(2) : 321-332, 1989.
 - 47) 杉崎正志, 木野孔司 : 顎関節の臨床解剖。顎咬合誌 11(1) : 5-11, 1990.
 - 48) Hilbon, J. C. and Anastassiadis, P. A. : Glycosaminoglycans of skin, heart, lung, and bone of some animals. *Biochem. Biophys. Acta.* 215 : 57-69, 1970.
 - 49) Maroudas, A., Muir, H. and Wingham, J. : The correlation of fixed negative charge with glycosaminoglycan content of human articular cartilage. *Biochem. Biophys. Acta.* 177 : 492-500, 1969.
 - 50) Stockwell, R. A. : Change in the acid glycosaminoglycan content of the matrix of ageing human articular cartilage. *Ann. Rheum. Dis.* 29 : 509-515, 1970.
 - 51) 木全弘治 : 分離法。 (日本生化学会編。新生物化学実験講座 3), 東京, 1991, 東京化学同人, 3-18.
 - 52) Evanko, S. P. and Vogel, K. G. : Ultrastructure and proteoglycan composition in the developing fibrocartilage region of bovine tendon. *Matrix* 10 : 420-436, 1990.
 - 53) Fisher, L. W., Hawkins, G. R., Tuross, N. and Termine, J. D. : Purification and partial characterization of small proteoglycans I and II, bone sialoprotein I and II, and osteonectin from the mineral compartment of developing human bone. *J. Biol. Chem.* 262(20) : 9702-9708, 1987.
 - 54) Vilim, V. and Krajickova, J. : Proteoglycans of human articular cartilage. *Biochem. J.* 273 : 579-585, 1991.
 - 55) Heinegard, D., Bjorne-persson, A., Coster, L., Franzen, A., Gardell, S., Malmstrom, A., Paulsson, M., Sandfalk, R. and Vogel, K. : The core proteins of large and small interstitial proteoglycans from various connective tissue from distinct subgroups. *Biochem. J.* 230 : 181-194, 1985.
 - 56) Roughley, P. J., Mcnicol, D., Santer, V. and Buckwalter, J. : The presence of a cartilage-like proteoglycan in the adult human meniscus. *Biochem. J.* 197 : 77-83, 1981.
 - 57) Fisher, L. W., Termine, J. D., Dejter, Jr, S. W., Whitson, S. W., Yanagishita, M., Kimura, J. H., Hascall, V. C., Kleinman, H. K., Hassell, J. R. and Nilsson, B. : Proteoglycans of developing bone. *J. Biol. Chem.* 258 : 6588-6594, 1983.
 - 58) Rosenberg, L. C., Choi, H. U., Tang, L., Jonson, T. L. and Pal, S. : Isolation of dermatan sulfate proteoglycans from mature bovine articular cartilage. *J. Biol. Chem.* 260(10) : 6304-6313, 1985.
 - 59) Couchman, J. R., Caterson, B., Christner, J. E. and Baker, J. R. : Mapping by monoclonal antibody detection of glycosaminoglycans in connective tissues. *Nature* 307(16) : 650-652, 1984.
 - 60) Caterson, B., Christner, J. E., Baker, J. R. and Couchman, J. R. : Production and characterization of monoclonal antibody directed against connective tissue proteoglycans. *Fed. Proc.* 44(2) : 386-393, 1985.
 - 61) Caterson, B., Christner, J. E. and Baker, J. R. : Identification of a monoclonal antibody that specifically recognizes corneal and skeletal

- keratan sulfate. *J. Biol. Chem.* 258 : 8848-8853, 1983.
- 62) Habuchi, H., Yamagata, T., Iwata, H. and Suzuki, S. : The occurrence of a wide variety of dermatan sulfatechondroitin sulfate copolymers in fibrous cartilage. *J. Biol. Chem.* 248 (17) : 6019-6928, 1973.
 - 63) Jarjava, H., Heino, J., Krusius, T., Vuorio, E. and Tammi, M. : The small dermatan sulfate proteoglycans synthesized by fibroblasts derived from skin, synovium, and gingiva show tissue-related heterogeneity. *Biochem. J.* 256 : 35-40, 1988.
 - 64) Vogel, K. G., Paulsson, M. and Heingard, D. : Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon. *Biochem. J.* 223 : 587-597, 1984.
 - 65) Bianco, P., Fisher, L. W., Young, M. F., Termine, J. D. and Robey, P. G. : Expression and localization of the two small proteoglycans biglycan and decorin in developing human skeltal and non-skeltal tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 38 : 1549-1563, 1990.
 - 66) 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. 歯科学報 71 (5) : 1311-1330, 1971.
 - 67) Ropes, M. W. and Bennet, G. A. : The origin and nature of normal synovial fluid. *J. Clin. Invest.* 18 : 351-372, 1939.
 - 68) Carroll, G. J. : Spectrophotometric measurement of proteoglycans in osteoarthritic synovial fluid. *Ann. Rheu. Dis.* 46 : 375-379, 1987.
 - 69) Witter, J., Roughley, P. J., Webber, C., Roberts, N., Keystone, E. and Poole, A. B. : The immunologic detection and characterization of cartilage proteoglycan degradation products in synovial fluids of patients with arthritis. *Arth. Rheum.* 30 : 519-529, 1987.
 - 70) Israel, H. A., Sead-Nejad, F. and Ratcliffe, A. : Early diagnosis of osteoarthrosis of the temporomandibular joint. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 49 : 709-711, 1991.
 - 71) Ratcliffe, A., Doherty, M., Maini, R. N. and Hardingman, T. E. : Increased concentration of proteoglycan components in the synovial fluids of patients with acute but not chronic joint disease. *Ann. Rheum. Dis.* 47 : 826-832, 1988.
 - 72) Lohmander, L. S., Dahlberg, L., Ryd, L. and Heinegard, D. : Increased levels of proteoglycan fragments in knee joint fluid after injury. *Arth. Reum.* 32 : 1434-1442, 1989.