デュブイトレン拘縮における手掌腱膜の化学的分析

大分医科大学整形外科

高 見 博 昭・麻 生 邦 一

友 成 一 徳・真 角 昭 吾

Chemical Analysis of Palmar Aponeurosis in Dupuytren's Disease

by

Hiroaki Takami, Kuniichi Aso, Kazunori Tomonari
and Shogo Masumi

Department of Orthopedic Surgery, Medical College of Oita

Collagen and mucopolysaccharides of the palmar aponeurosis in Dupuytren's contracture were compared with those of the normal palmar aponeurosis and palmaris longus tendon. The collagen was extracted by salt differential method and analysed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The results showed that collagen was mainly composed of type I, and slightly of type V, but type III collagen was not found. No difference was seen between Dupuytren's aponeurosis and normal aponeurosis. In the amino acid composition of 1.5M fraction collagen in Dupuytren's aponeurosis, hydroxyproline decreased in α_1 (I) chain, whereas serine increased and Hydroxyproline decreased in α_2 (I) chain. Analysis of the glycosaminoglycan of Dupuytren's aponeurosis revealed the extremely increased dermatan sulfate, in addition to the appearance of chondroitin sulfate, hyaluronic acid and heparan sulfate, which resembled the skin pattern.

デュブイトレン拘縮における手掌腱膜は、正常手掌腱膜と較べ、コラーゲン・タイプIIIが多いと言われていたが、glycosaminoglycans (以下GAGと略す) についての報告はみられない。今回我々は本疾患について、コラーゲンの他GAGの変化について正常腱膜を対照として検討した。

材料および方法

73才男子および54才男子のデュブイトレン拘縮の手掌腱膜(湿性重量861mgおよび1,234mg)を用いた。液体窒素にて凍結粉碎後、homogenizeし、0.5M-酢酸中にてペプシン消化を行い、上清を1M-Trisにて中和した後、20% NaClにてコラーゲンを凝集、沈澱させた。これを1M-NaCl 0.05M-Tris・HCl buffer (pH 7.5)にて溶解し、1.5M, 1.9M, 2.4Mの各塩濃度にて順次透析を行いコラーゲンを分別沈澱・回収した(表1)。抽出したコラーゲンをを用い、(1)3.6M Urea

を含んだ5%濃度のSDS-polyacrylamide gel電気泳動を行った。(2)1.5Mで塩析されたコラーゲンについて、WHATMANNのCM-32を用いCMセルローズ・クロマトグラフィーを行った。(3)1.5M画分のコラーゲンについてHITACHI: 835-30自動アミノ酸分析器を用いて、アミノ酸組成を調べた。また採取したデュブイトレン腱膜の一部(乾燥重量51.1mgおよび315mg)をNaOH、プロナーゼ処理後、粗GAGを得た(表2)。これを用い、(1)ウロン酸測定を行った。(2)アセテート膜電気泳動(1次元泳動液に0.1Mピリジン-0.47Mギ酸液を、2次元に0.1M酢酸バリウム液を用いた)を行った。これによって、GAG成分を分離し、定性を行った。(3)dimethylsulphoxide(以下DMSOと略す。)を用いて定量されるGAG各成分について調べた³⁾⁵⁾。

結 果

酸可溶性コラーゲンの全回収量はそれぞれ65.4mg、

表1 METHODS

表2 酸性ムコ多糖の分離方法

65.8 mgであった。デュブイトレン腱膜コラーゲンの1.5 M, 1.9 M, 2.4 M各分画の電気泳動パターンをみると、各分画ともにI型コラーゲンが、主要構成成分であり、III型コラーゲンは検出されなかった。

しかし2.4 M上清画分にて, Minor Component とし

SDS-PAGE

図1 Dupuytren's Aponeurosis

図2 Chromatography

図3 1.5M NaCl Fraction of Dupuytren's aponeurosis

てV型コラーゲンが見出された(図1)。

1.5 M画分をCMセルロース・イオン交換クロマトグラフィーにて分離すると、2つのピークが得られた(図2)。各ピークを再びSDS-PAGEにて検討した処、低イオン強度で溶出される最初のピークの成分は $\alpha_1(I)$ であり、次のピークは $\alpha_2(I)$ であった(図3)。一方III型成分はこのCMセルロースによる画分でも見出されなかった。また各成分のアミノ酸分析を見ると、表3の如く $\alpha_1(I)$ 鎖ではヒドロキシプロリン(Hypro)の減少、 $\alpha_2(I)$ 鎖ではセリン(Ser)の増加とHypro

図4 Dupuytren's Aponeurosis

図5 Normal Aponeurosis

の減少をみとめた。またここでもシスティン(Cys)の存在がみとめられないことから、III型コラーゲンが1.5 M-NaCl画分にも存在しないことがわかる¹⁰⁾。

結合組織の多糖成分であるGAGをアセテート膜電気泳動によって検討したところ、デュブイトレン腱膜では、ヒアルロン酸(HA)、デルマトン硫酸(DS)、コンドロイチン硫酸(CS)、ヘパラン硫酸(HS)が検出された(図4)。正常手掌腱膜のGAG、手掌腱膜より移行する正常長掌筋腱のGAGの電気泳動は図5、図6にそれぞれ示す。デュブイトレン腱膜のGAGの泳動パ

表3 デュプイトレン拘縮腱膜のアミノ酸組成

	Dupuytren (1.5M Fraction)		ヒトコラーゲン α 鎖のアミノ酸組織成	
Sample	α_1 (I)	α_2 (I)	α_1 (I)	α_2 (I)
DATE				
CySO ₃ H				
ASP				
Thr	44	48	46	45
Ser	17	20	18	18
GLU	39	64	35	30
GLy	76	84	77	70
ALa	327	323	330	331
Cys	115	101	119	105
VaL	2	0	N.D	N.D
Met	17	21	19	35
ILe	4	6	5.3	4.7
Leu	8	14	8.2	16
Tyr	19	24	20	33
Phe	2	5	2.1	3.2
Lys	12	10	13	11
NH ₃	27	22	27	20
HIS				
Trp	3	8	4	10
Arg				
Pro	48	43	49	51
Hypr	135	109	118	114
HyLy	93	80	115.1	106.2
計	7	7	10	12
	1006	992	1015.7	1015.1

(アミノ酸1000個当り)

ターンは正常手掌腱膜や長掌筋腱の泳動パターンよりも、皮膚GAGの泳動パターンに近いことを示している。GAGの各成分についてDMSO抽出法によりHAとDSとの比をみるとデュプイトレン腱膜が各サンプルにおいて1対5とよび1対11であり、正常腱膜が1対2および1対5、長掌筋腱が1対2であった。いずれも

デュプイトレン腱膜においてはDSが著明に増えていることがわかった。

考 察

1983年 Gelberman らはデュプイトレン拘縮の腱膜において Myofibroblast が重要な働きをしていることを

図6 Palmaris Longus tendon

指摘し、コラーゲン合成の促進、Turnoverの亢進とともにIII型コラーゲンの有意の増加を認めたと報告している⁴⁾。1901年 Brickley-Parsons らも GAG の増量とともにIII型コラーゲンが増えていることを報告している¹⁾。今回我々のコラーゲン分析では、I型コラーゲンが主で、III型コラーゲンは析出されず、2.4 M上清画分においてV型コラーゲンが析出された。V型コラーゲンは膜に存在し、未熟な結合組織や、肥大型瘢痕組織にも豊富に存在していると言われていたが、その存在意義については今後の検索が待たれるところである²⁾⁶⁾⁷⁾。またムコ多糖分析の結果は、デュプイトレン腱膜の電気泳動パターンは正常腱膜や長掌筋腱のそれと異なり、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸の出現とともに、デルマタン硫酸の有意の増加をみた⁸⁾⁹⁾。これは皮膚型パターンであり、デュプイトレン腱膜のGAGからは腱ではなく皮膚に近くなるという興味ある知見を得た。

ま と め

1. デュプイトレン拘縮の腱膜および正常の手掌腱膜についてコラーゲンとムコ多糖の化学的分析を行った。
2. デュプイトレン腱膜に正常腱膜ともに、I型コ

ラーゲンが主要構成成分であり、III型はみられなかった。

3. 一方両者ともにV型コラーゲンがみとめられた。

4. アミノ酸組成をみると、デュプイトレン腱膜の α_1 (I) 鎖ではヒドロキシプロリンの減少、 α_2 (I) 鎖ではセリンの増加及びヒドロキシプロリンの減少をみた。

5. 酸性ムコ多糖分析ではデュプイトレン腱膜は皮膚型に近いことがわかった。

参 考 文 献

- 1) Brickley-Parsons, D. et al.: Biochemical changes in the Collagen of the Palmar Fascia in Patients with Dupuytren's Disease. J. Bone and Joint Surg., 63-A: 787-797, 1981.
- 2) 岩田 久: 整形外科領域におけるムコ多糖分析. 整形災害外科, 24: 1399-1408, 1983.
- 3) 藤本大三郎・他: コラーゲンの調整・コラーゲンの分析. 31-77, 講談社, 東京, 1985.
- 4) Gelberman, R. H.: Dupuytren's Contracture. J. Bone and Joint Surg., 62-A: 425-432, 1980.
- 5) 畑隆一郎: 蛋白質・核酸・酵素. 18: 848-857, 1973.
- 6) 梶川欽一郎: コラーゲン分子の生化学. 結合組織, 150-158, 金原出版株式会社, 東京, 1984.
- 7) 新名正由: 整形外科領域におけるムコ多糖分析. 整形災害外科, 26: 1409-1425, 1983.
- 8) 大平敦彦: 細胞表面に存在するヘパラン硫酸. プロテオグリカンの構造と機能. 代謝, 21: 305-313, 1984.
- 9) 瀬野信子: プロテオグリカンの構造と機能. 代謝, 18: 603-612, 1981.
- 10) 高橋礼子: アミノ酸組成の決定法. タンパク質の化学II, 41-72, 東京化学同人, 1984.

質 問 産業医科大学 鈴木 勝己
再発をくり返すものも同じ結果でしょうか。

解 答 大分医科大学 高見 博昭
再発例についての分析はまだ行っていません。

Gelberman らは、電顕的には初発例に見られる特徴的な Myofibroblast の存在に対して、再発例においては、大きな Microtubule の存在を指摘していますので、生化学的にもやはり違いがあることも考えられます。今後、機会があれば調べてみようと思っています。