

変形性関節症における骨棘形成機序の解明

—— コラーゲンならびにプロテオグリカン性状からみた検討 ——

東京慈恵会医科大学整形外科科学講座

舟 木 清 美

(受付 平成 14 年 2 月 14 日)

ELUCIDATION OF THE MECHANISM OF OSTEOCHONDROPHYTE FORMATION IN OSTEOARTHRITIS —— INVESTIGATION OF CHARACTERISTICS OF COLLAGEN AND PROTEOGLYCAN ——

Kiyomi FUNAKI

Department of Orthopaedic Surgery, The Jikei University School of Medicine

I used immunohistologic and biochemical methods to investigate the basal metabolism of osteochondrophytes, which form in patients with osteoarthritis. Osteochondrophytes were obtained from patients with osteoarthritis of the knee. The tissue samples were examined immunohistologically using monoclonal antibodies against the cartilage matrix. Furthermore, high-performance liquid chromatographic-fluorescence detection was used to examine extracted collagen for the presence of cross-links. Where osteochondrophytes formed, the membranous ossification layer of the osteochondrophyte base region closer to the bone was positive for type I collagen. In contrast, the endochondral ossification layer of the spinous process protruding from the osteochondrophyte base into the joint space contained a mixture of type I and type II collagen and cartilage-type proteoglycan. In regard to the reducible cross-links of collagen, the proportion of hydroxylysinoxonorleucine in osteochondrophytes was higher than that in normal cartilage and resembled that reported in reducible cross-links in degenerated cartilage. These results suggest that osteochondrophyte formation represents degeneration, rather than repair, of the joint cartilage.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2002; 117: 261-75)

Key words: osteoarthritis, osteochondrophyte, collagen, proteoglycan

I. 緒 言

関節軟骨には、血管、神経、リンパ管などが存在しないため、軟骨細胞は基質を介して伝達される力学的ならびに液性刺激によって代謝調節を行っている¹⁾²⁾。すなわち、軟骨細胞は、主たる基質構成成分であるコラーゲンやプロテオグリカンを産生するのみならず、基質分解酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ (matrixmetallo-

proteinases, MMPs) やそのインヒビターである tissue inhibitor of metalloproteinase, さらには サイトカインなども産生し、軟骨基質を合成、分解している³⁾⁻⁵⁾。一方、変形性関節症 (osteoarthritis; OA) は、関節軟骨を中心とする関節構成体の退行変性の特徴とする疾患であるが⁶⁾⁻⁸⁾、その骨・軟骨の変性破壊過程では、同時に関節辺縁から滑膜附着部にかけての増殖性変化を伴う。この部分は、骨と軟骨様組織の混在する隆起した形態

を示すことから、一般に、osteochondrophyte (O-C) と呼ばれているが、こうした骨・軟骨組織がいかなる機序によって形成されるものであるかについては、いまだ十分な解明がなされていない。この点を明らかにするため、著者は、ヒト OA の O-C について免疫組織化学的検索を行うとともに、コラーゲン代謝に関する生化学的分析を行った。

II. 研究材料および方法

1. 研究材料

OA と診断し、腰野氏の変形性膝関節症 X 線像分類⁹⁾にて全例 grade 4 以上で人工膝関節置換術を施行した 10 症例(62 歳から 68 歳、平均 64.8 歳)から切除された骨軟骨片より、脛骨関節面の内側ならびに外側に形成された関節骨軟骨棘 10 検体を採取し研究材料とした。また、対象材料として、腫瘍により下肢切断を施行した症例のうち年齢がほぼ一致する男性 2 例(58 歳、62 歳)の健康関節軟骨を採取した。さらに、同様の適応で人工膝関節置換術を施行した OA 症例 5 例の手術に際して切除した骨軟骨片について、軟骨のみを 7 mm×7 mm 大に細切した。それぞれの軟骨片の一部については、組織学的観察の切片用にパラフィン包埋し、残る部分は生化学分析用サンプルとした。全検体について、その採取に際しては研究に対する同意を得たうえで行った。

2. 研究方法

1) 免疫組織学的検索¹⁰⁾

(1) 組織切片の作製
採取した O-C を直ちに 3-4 mm の厚さに薄切した後、4% パラホルムアルデヒド溶液 (pH 7.4) にて 3 時間固定した。次に、100% エタノールにより 1 週間脱脂を行った後、5% ethylenediamine tetracetic acid (EDTA) 溶液 (pH 6.5) を用いて 3 週間脱灰した。これらの試料をパラフィンに包埋し、2.0 μm の厚さに薄切して組織切片を作製した。

(2) 1 次抗体

i) 抗ヒト I 型, II 型コラーゲン抗体

FUJI pharmaceuticals 社製のモノクローナル抗体を使用した。

ii) 抗アロテオグリカン抗体
抗コンドロイチン 6 硫酸アロテオグリカン抗体 (3-B-3), 抗コンドロイチン 4 硫酸アロテオグリカン抗体 (2-B-6) は生化学工業社製のモノクローナル抗体を使用した。

iii) 抗ヒトマトリックスマタロテアゼ
-1, -3 (MMP-1, 3) 抗体

FUJI pharmaceuticals 社製のモノクローナル抗体を使用した。

iv) 抗ヒト CD34 抗体

IMMUNOTECH 社製のモノクローナル抗体を使用した。

v) 抗 TGF- β 抗体

R & D 社製のモノクローナル抗体を使用した。

(3) 免疫組織染色

免疫組織染色は Vector 社の Vectastain ABC キットを用いてワサビペルオキシダーゼ染色法に準じて行った。すなわち、組織切片を脱パラフィンした後、0.3% H_2O_2 を含むメタノール溶液を滴下して 30 分間反応させ、内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。軟骨基質中のヒアルロン酸を分解するため、1.25% ヒアラナーゼ (Sigma 社) 溶液を 37°C で 20 分間作用させ、さらにコンドロイチン硫酸に対する染色では、コンドロイチナーゼ ABC (生化学工業社) 消化を室温で 5 分間加えた。次に、2% bovine serum albumin (BSA, Sigma 社) を含む希釈正常血清を室温で 60 分間反応させて非特異的な蛋白質の吸着反応を除去した。

そこで染色に用いる各種抗体 (100-1,000 倍希釈)、すなわち 1 次抗体を 4°C、10 時間反応させ、phosphate buffered saline (PBS) で洗浄した後、さらに 50-200 倍に希釈したピオチン化 2 次抗体を室温で 30 分間反応させた。PBS で洗浄した後、アビジン DH とピオチン化ワサビペルオキシダーゼ H を用いて avidin-biotin peroxidase complex (ABC) 反応を室温で 30 分間行い、最後に 0.3% diamminbenzidine tetrahydrochloride (DAB) 溶液中で発色させた後、切片を洗浄、封入した。

2) Goland-吉木法による類骨の染色¹⁰⁾

採取した O-C を直ちに 3-4 mm の厚さに薄切した後、塩化シアンル溶液 (塩化シアンル 0.5 g を

メタノール 100 ml で完全に溶解し、N-メチルモルホリン 1 ml を加える)で 48 時間固定した。次に 10% EDTA 溶液 (pH 7.4) を用いて 3 日間脱灰した。これらの試料をパラフィンに包埋し、2.0 μm の厚さで薄切して組織切片を作製した。作製した組織切片をナイヤーのヘマトキシリンに 10 分間、さらにエオジン液に 30 秒間反応させた後、洗浄、封入した。

3) 生化学的検査

(1) コラーゲン含有量の測定¹¹⁾⁻¹³⁾

O-C に含まれるコラーゲンの測定は、各組織を 6N 共沸塩酸中で 110°C 24 時間加水分解した後、アミノ酸組織分析を行いその hydroxyproline (Hyp) 量から換算した。算出された全コラーゲン量は組織の湿性重量当たりの百分率として示した。

(2) コラーゲンの分離、精製¹²⁾⁻¹⁴⁾

O-C を液体窒素中で粉碎し、組織湿性重量を測定した。以下の操作は、4°C の条件下で行った。組織湿性重量の約 20 倍量 (v/w) の 0.5 M EDTA in 0.05 M Tris buffer, pH 7.40 を加え、96 時間 (48 時間 \times 2) の脱灰抽出を行った。沈査を蒸留水で洗浄し、組織湿性重量の約 20 倍量 (v/w) の 1.0 M NaCl in 0.05 M Tris buffer, pH 7.40 で 48 時間 (24 時間 \times 2)、さらに 0.5 M 酢酸溶液を用いて 48 時間 (24 時間 \times 2) の搅拌抽出操作を行い、それぞれ中性塩可溶性および酸可溶性コラーゲンを調製した。酸可溶性コラーゲン抽出後の沈査を蒸留水で十分洗浄し、凍結乾燥したものを不溶性コラーゲンとした。

(3) 可溶性コラーゲン量の測定

中性塩および酸可溶性コラーゲン量は、各可溶抽出画分を 0.1 M 酢酸溶液で透析し、凍結乾燥した後、Hyp 量から換算して、全コラーゲン量に対する可溶性率として算出した。

(4) 架橋結合の分離・同定¹¹⁾

不溶性コラーゲンを potassium phosphate buffer, pH 7.6 (ionic strength=0.15) に水加させた後に、sodium borohydride (NaBH₄) を加え 37°C で 60 分間還元した。つぎに還元されたコラーゲンを十分に蒸留水で洗浄し、凍結乾燥後、6N 共沸塩酸中で 110°C 24 時間加水分解した。この水分解物から、還元性架橋結合を斉藤ら¹²⁾の方法

により高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて分離、定量した。すなわち、水分解物をエバポレーターで処理後、0.2 N sodium citrate buffer, pH 2.20 に溶解し、HPLC を用いて以下の条件で分析した。カラムは、日本分光社製アミノ酸分析用 Na 型陽イオン交換カラム (Aapack Na, 0.9 \times 10 cm) を用い、カラム温度は 55°C、流速は 0.5 ml/min とした。移動相は、(A) 0.2 N sodium citrate buffer/7% ethanol, (pH 3.20) と (B) 0.6 N sodium citrate buffer, (pH 10.00) の二元グラジェントとし、分析開始後の 30 分間を pH 3.20-5.20 までの直線勾配溶出、30 分から 50 分まではアインクラーテックス溶出、その後 10 分間で pH 10 までの直線勾配溶出を行った。還元性架橋である dihydroxylysino-norleucine (DHLNL), hydroxylysino-norleucine (HLNL), lysino-norleucine (LNL) の検出には、O-phthalaldehyde を用いたボストカラム法で行った。なお、各架橋結合量は、単位コラーゲン量当たりとして算出した。

4) 統計解析

HLNL に対する DHLNL の比の部位別 (健康関節軟骨, 変形性関節軟骨, osteochondrophyte) の差異に関する統計学的な検討は、Mann-Whitney Test を用いて行い、 $p < 0.01$ を有意差ありとした。

III. 結 果

1. 免疫組織化学的検査

いずれの O-C の先端においても、主として 4 つの組織象の混在が観察された。すなわち、表層を被う線維性の結合組織あるいは軟骨様の組織と、深層の石灰化骨組織と軟骨様組織である。こうした O-C の形成過程をより詳細に観察するため、O-C が最も旺盛に発育していると考えられる基部について、骨側基部と関節腔側基部に分けて検討した (Fig. 1)。

(1) O-C 基部骨側

O-C 基部骨側の表層は線維性結合組織で被われ (Fig. 2-A), その下層には走行の不均一な骨梁構造が観察された (Fig. 2-B)。この線維性結合組織の中には線維芽細胞様の細胞が存在し (Fig. 2-A, B), 表層から深層にわたってその細胞外基質は I 型コラーゲンに対する抗体で染色されたが

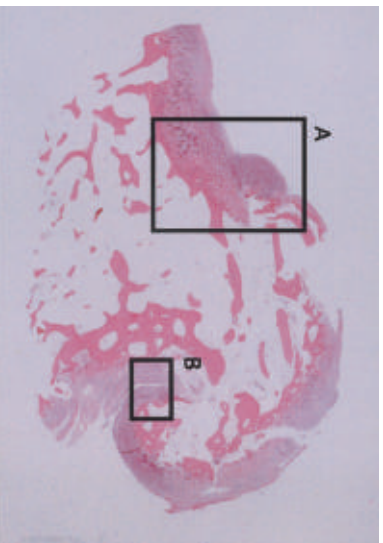


Fig. 1. Hematoxylin and eosin staining of an osteochondrophyte ($\times 2$).

(A) The joint space side of osteochondrophyte
(B) The bone side of osteochondrophyte

(Fig. 2-C, D), 軟骨の主要な構成成分である II 型コラーゲンに対する抗体での染色性は認められな

かった。また、軟骨のもう一つの主要構成成分であるプロテオグリカンに対する抗体である抗コンドロイチン 4, 6 硫酸に対する抗体による染色性も認められなかった。さらに、線維性組織との境界の石灰化骨の表層には、吉木法染色で染色される類骨が観察された (Fig. 3).

(2) O-C 基部関節腔側

O-C 基部関節腔側の細胞外基質では、線維性の結合組織、サフランソン O 染色でオルトクロマジンを示す軟骨様組織、および石灰化骨組織の 3 種の組織の混在が観察された (Fig. 4-A, D). I 型コラーゲンに対する抗体では、O-C 基部の表面を被う線維性の結合組織と石灰化骨組織が強く染色され (Fig. 5-A), 変性軟骨と O-C の移行部の間層の細胞間基質にもわずかな染色性が観察された (Fig. 5-B). 次に、軟骨の主要構成成分である II 型コラーゲンに対する抗体で染色してみると、O-

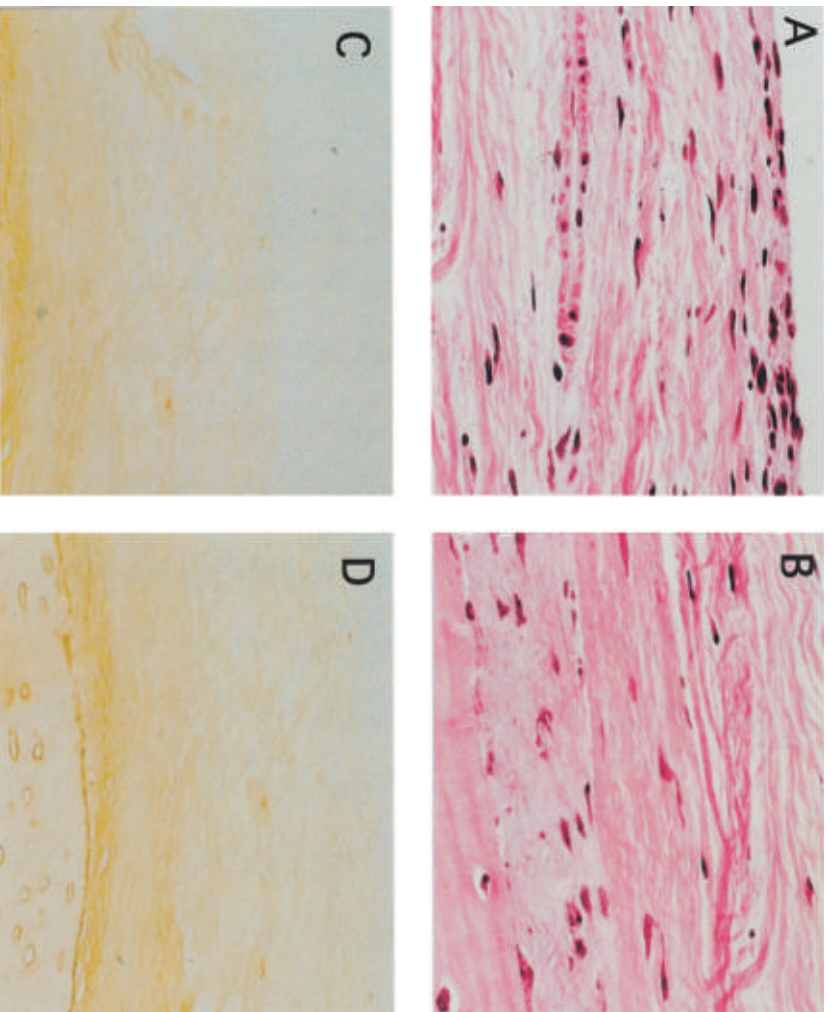


Fig. 2. Hematoxylin and eosin staining (A, B) and anti-type I collagen antibodies staining (C, D) of the superficial (A, C) and deep (B, D) zones of an osteochondrophyte on the bone side ($\times 66$).

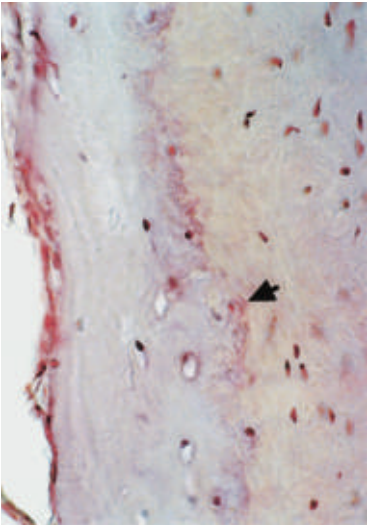


Fig. 3. Goland-Yoshiki's staining method ($\times 66$). Osteoids present between fibrous tissue and calcified layer of an osteocondrophyte on the bone side.

C 基部表面の線維性の結合組織は染色されず、サフランin O 染色でオルトクロマジーを (Fig. 4-D, E, F) 示す軟骨様組織の細胞間基質がほぼ一様に染色された (Fig. 5-D, E, F).

細胞領域についてみると、変性軟骨との移行部では、中間層から深層にかけて円形の細胞が多数存在し (Fig. 4-B, E), これらの細胞領域ではわずかに強い染色性が観察された (Fig. 5-E)。一方, O-C が立ち上がる部位で、表面から隆起状に盛り上がる部分の (Fig. 4-C, F) 中間層から表面の基質に抗 II 型コラーゲン抗体による染色性が観察された (Fig. 5-C, F)。こうした部位にも円形の細胞が存在するものの、その数はごくわずかであり (Fig. 4-C, F), これらの細胞領域には抗 II 型コラーゲン抗体による強い染色性は認められなかった (Fig. 5-F)。次に、プロテオグリカンの局在についてみると、変性軟骨との移行部および隆起状に立ち上がる O-C の基質は、軟骨型コンドロイチン硫酸プロテオグリカンを認識するモノクローナル抗体である 2-B-6 ならびに 3-B-3 抗体によって均一に染色された (Fig. 6-C, F)。一方、関節辺縁の変性軟骨との移行部の中間層から深層では、

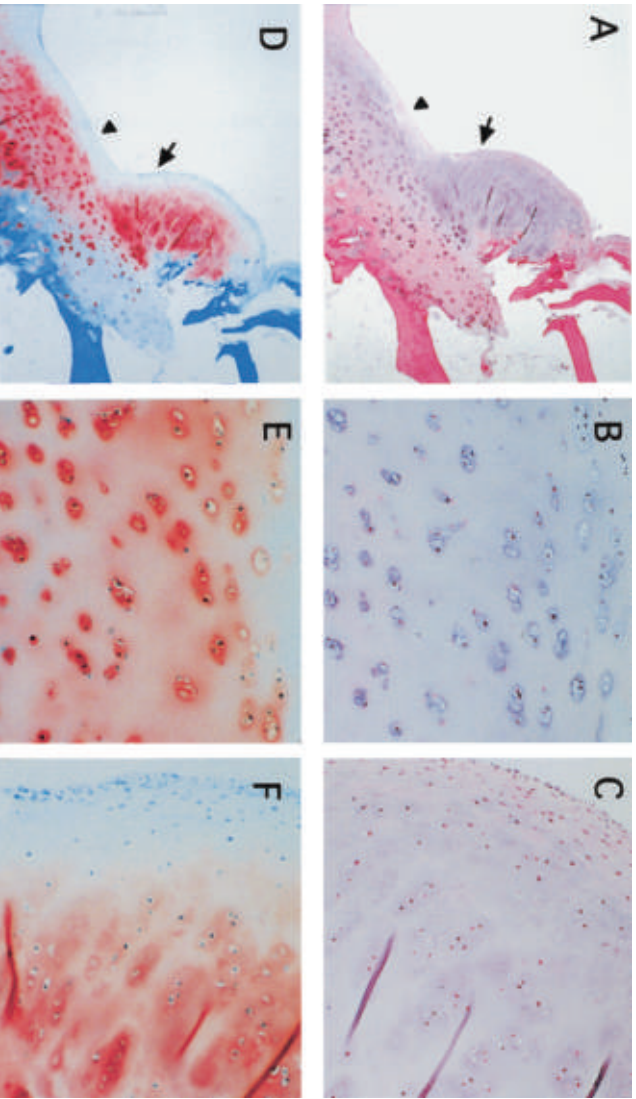


Fig. 4. Hematoxylin and eosin staining (A, B, C) and safranin-O staining (D, E, F) of an osteochondrophyte (O-C) in the joint space side (A, D: $\times 13.2$, B, C, E, F $\times 66$).

Many circular cells (B) and intense orthochromasia (E) are observed in the territorial and interterritorial regions of the mid and deep zones of the transition segment from degenerated cartilage to developed O-C (arrow-head). The O-C segment protruding into the joint space (arrow) presents with a few circular cells (C) and orthochromasia (F) in the interterritorial regions.

JS: Joint space

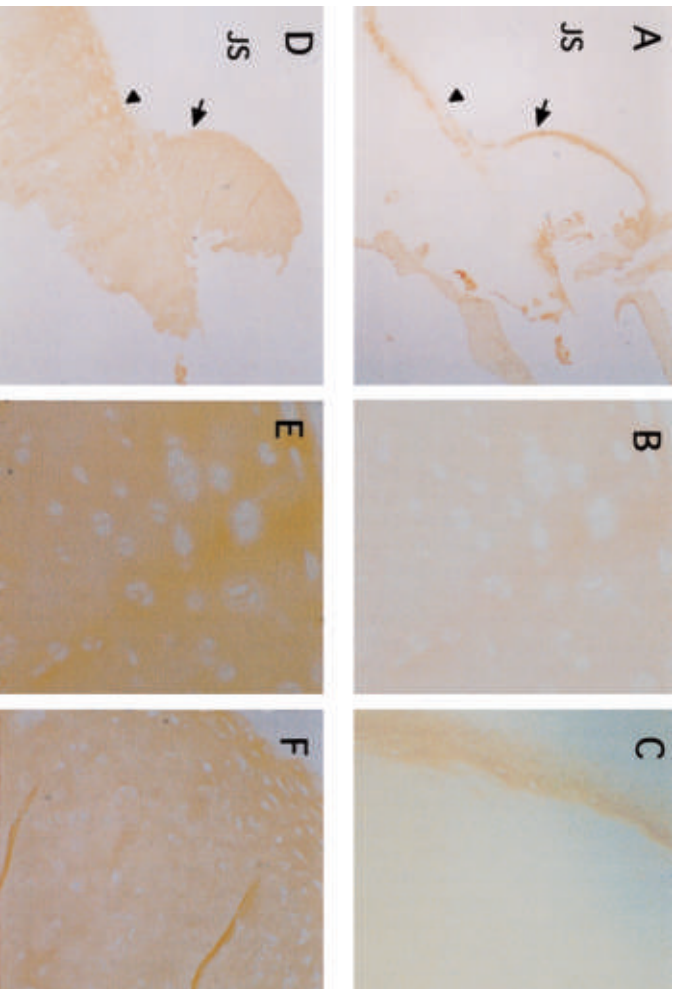


Fig. 5. Immunohistochemical staining with anti-type I collagen antibodies (A, B, C) and anti-type II collagen antibodies (D, E, F) (A, D; $\times 13.2$, B, C, E, F; $\times 66$). Both the transition (arrow-head) and developed osteochondrophyte segment (arrow) demonstrate positive staining of the surface and calcified layer (A, C) with anti-type I collagen antibodies. Very weak (B) staining with anti-type I collagen antibodies is observed in the mid-zone of the transition segment (arrow-head). Staining with anti-type II collagen antibodies yielded an even staining pattern throughout all layers of both transition (arrow-head) and developed osteochondrophyte segments (E, F) (arrow). JS: Joint space

2-B-6ならびに3-B-3抗体による細胞間領域の染色性は低下しているのに対して、サフラニンO染色で強いオルトクロマジーを示す (Fig. 4-E) 円形細胞の細胞領域の染色性は良好に保たれていた (Fig. 6-B, E). さらに、軟骨基質のII型コラーゲンおよびプロテオグリカンの主たる分解酵素と考えられている MMP-1ならびに MMP-3の局在についてみると、MMP-1に対する抗体では、関節辺縁の変性軟骨との移行部の表層を被う線維性結合組織、軟骨様組織と石灰化骨組織の境界部および表層から中間層の細胞間領域に染色性が観察された (Fig. 7-A). MMP-3 に対する抗体による染色では、変性軟骨との移行部の中間層の細胞間基質にのみ染色性が認められた (Fig. 7-C). しかし、これらの移行部の表層から隆起状に立ち上がる O-C の基質には、MMP-1 および MMP-3 のい

ずれに対する抗体での染色性も観察されなかった (Fig. 7-B, D).

O-C 形成における血管新生の関与について検討する目的で、主として血管内皮細胞で合成される糖蛋白の一つである CD34 に対する抗体を用いてその局在を観察した. その結果、関節辺縁の変性軟骨から O-C への移行部の軟骨様組織の深層およびこれに接する石灰化骨組織との境界には、本抗体で明瞭に染色される微細な血管組織の存在が認められた (Fig. 8-A, B). また、隆起状に立ち上がる O-C の先端部にも本抗体に染色される微細血管の基質内への侵入像が認められた (Fig. 8-C, D).

さらに、骨・軟骨形成において、軟骨細胞の増殖や基質蛋白産生に影響を与える重要な成長因子の1つである TGF- β に対する抗体を用いてその

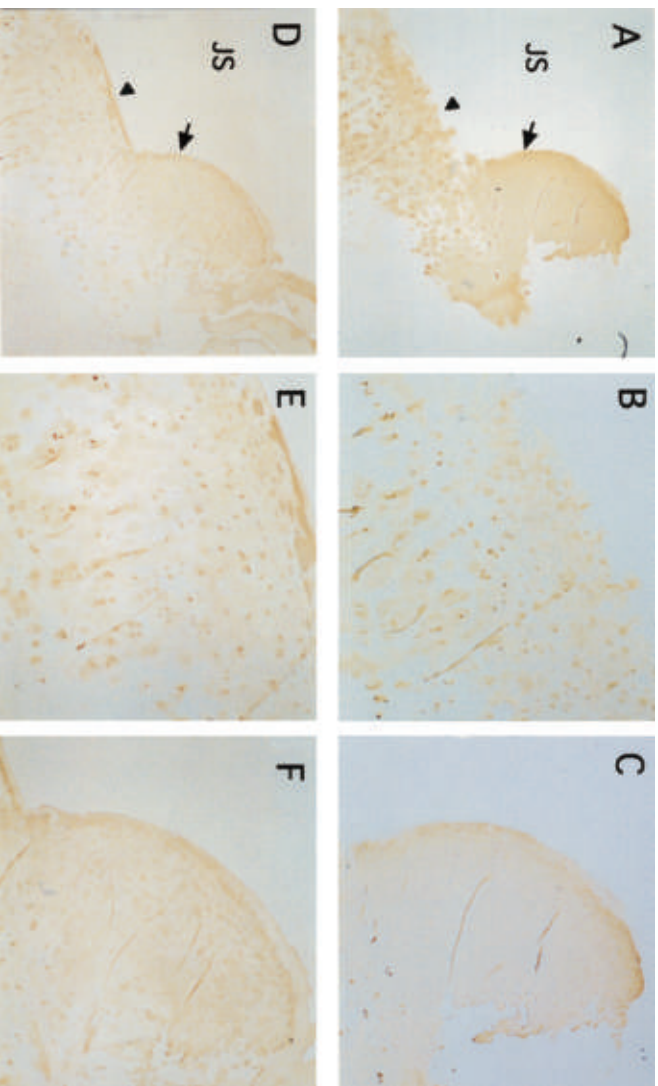


Fig. 6. Immunohistochemical staining with anti-4-sulfated (A, B, C) and anti-6-sulfated (D, E, F) chondroitin proteoglycan antibodies (A, D; $\times 132$, B, C, E, F; $\times 33$). Similar staining patterns are observed in both transition (arrow-head) and developed osteochondrophyte segments (arrow). JS: Joint space

局在を検討したところ、関節辺縁の変性軟骨からO-Cへの移行部の軟骨様組織の深層細胞間基質 (Fig. 9-A, B) および隆起状に立ち上がるO-Cの先端部に (Fig. 9-C, D) 強い染色性が観察された。

2. 生化学的分析

(1) コラーゲン含有量と可溶性コラーゲン量
O-Cのコラーゲン含有量および、中性塩および酸抽出によって可溶化されるコラーゲン量は、それぞれ組織湿性重量の平均18% (14~26%) および0.6% (0.4~0.8%) であった。

(2) 還元性架橋結合量

HPICを用い、DHLNL, HLNL, LNLといった主要な架橋結合の分析を行った。まず、第一に、健常関節より得られた関節軟骨およびOA 5例より採取し、細切した関節軟骨のうち、組織学的に中等度、および高度の変性を示す軟骨組織の架橋結合の分析を行った。Fig. 10は、健常関節軟骨組織の架橋結合の分析パターン (Fig. 10-A-2) とその抗II型コラーゲン抗体による免疫染色組織像 (Fig. 10-A-1), Fig. 10-B, Cは、それぞれOA関

節軟骨組織のうち、変性が中等度である部分と高度である部分の関節軟骨組織のコラーゲンの還元性架橋結合の分析パターン (Fig. 10-B-2, C-2) と抗II型コラーゲン抗体による免疫染色組織像 (Fig. 10-B-1, C-1) である。健常な関節軟骨組織をII型コラーゲンに対する抗体で染色してみると、最深層を除き、軟骨の全層にわたる細胞領域が強く染色され、細胞間の基質も均一に染色された (Fig. 10-A-1)。こうした健常関節軟骨には、以前に報告されたごとく⁹⁾、主としてDHLNL, HLNL, LNLといった還元性架橋結合の存在が認められた (Fig. 10-A-2)。一方、肉眼的に中等度変性を認めるOA関節軟骨では、表面から浅層に存在する cell cluster 周囲のみが、抗II型コラーゲンに対する抗体で強く染色され、中間層から深層にかけての染色性は減弱していることが観察された (Fig. 10-B-1)。このように中等度に変性が進行した関節軟骨においても DHLNL, HLNL, LNL といった還元性架橋結合が観察されたが、健常関節軟骨に比べ、HLNL の比率が増加する傾

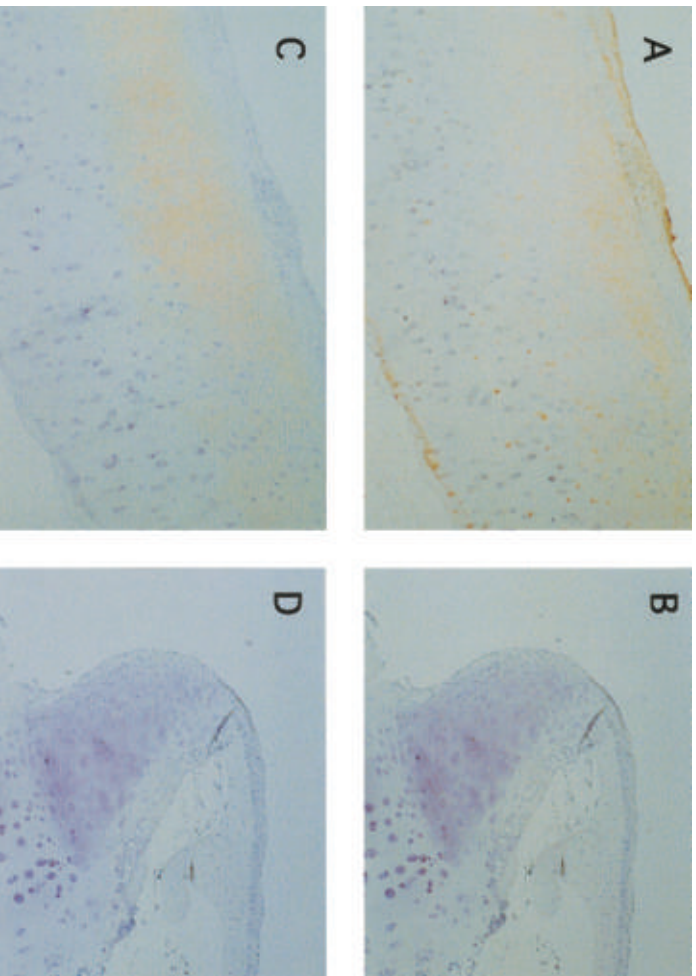


Fig. 7. Immunohistochemical staining by anti MMP-1 antibodies (A, B) and anti MMP-3 antibodies (C, D) ($\times 33$).

Positive staining with anti MMP-1 antibodies observed in the surface layers and the zone between cartilage-like tissue and calcified layers of the transition segment (marked with arrow-head in Fig. 9). Anti MMP-3 antibodies staining is detected in the mid-zone of the transition segment (C). The developed osteochondrocyte segments not show any staining signal, when stained with either anti MMP-1 as anti MMP-3 antibodies (B, D).

向を認めた (Fig. 10-B-2). さらに, 肉眼的にも高
度に変性した OA 関節軟骨では, 中間層から深層
にかけての抗 II 型コラーゲン抗体に対する染色
性はさらに減弱し, 中間層に残存する cell cluster
周囲も同抗体により弱く染色されるに過ぎなかつ
た (Fig. 10-C-1). こうして変性が高度になつた関
節軟骨コラーゲンの還元性架橋結合の分析パター
ンについてみると, 中等度の変性軟骨に比べて,
DHLNL の比率が減少する傾向が認められた
(Fig. 10-C-2). 一方, Fig. 11 は, O-C におけるコ
ラーゲンの還元性架橋結合の分析を行った結果で
ある. O-C にも, 健常関節軟骨と同様に, 主とし
て, DHLNL, HLNL, LNL といった還元性架橋
結合の存在が観察された. さらに, その還元性架
橋結合の分析パターンについて, 健常軟骨ならび
に OA 変性軟骨と比較すると, O-C では, 健常軟
骨に比べて DHLNL の比率が減少し HLNL の

比率が増加しており, その分析パターンは変性が
進行した OA 関節軟骨の分析パターンに類似し
ていることが判明した (Fig. 11). そこで, 各分析
パターンから算出した HLNL に対する DHLNL
の比を検討した. その結果, 健常関節軟骨, OA 関
節軟骨, O-C の平均 DHLNL/HLNL 値は, それ
ぞれ 6.71 ± 0.52 , 1.48 ± 0.26 , 1.42 ± 0.19 であり,
O-C と健常関節軟骨の間では有意差を認めるも
のの, O-C と OA 変性軟骨の間には有意な差は認
めず, この両者間の還元性架橋結合の分析パター
ンには類似性のあることが示された (Table 1).

IV. 考 察

OA の発症には数多くの因子が関与するが, そ
の主たる原因は関節軟骨の加齢変化を基盤とし,
過度の力学的ストレスが加わることによるもの
と一般に考えられている^{7,11)}. すなわち, 軟骨細胞は,

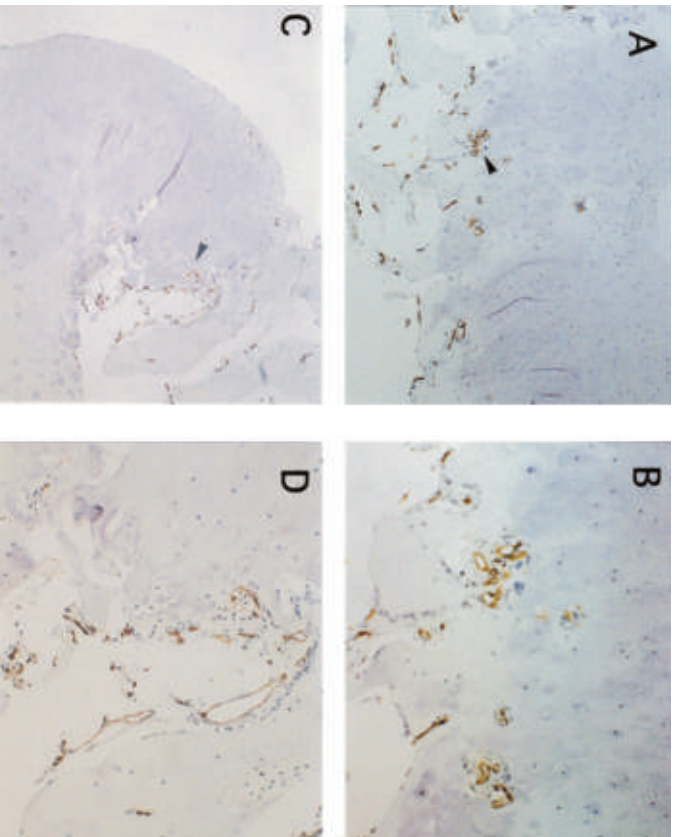


Fig. 8. Immunohistochemical staining by anti-CD34 antibodies (A, C; $\times 33$, B, D; $\times 66$). Minute blood vessels between cartilage-like zone and calcified layer demonstrate positive staining with anti-CD34 antibodies in both osteochondrophyte segments (C; arrow-head, D).

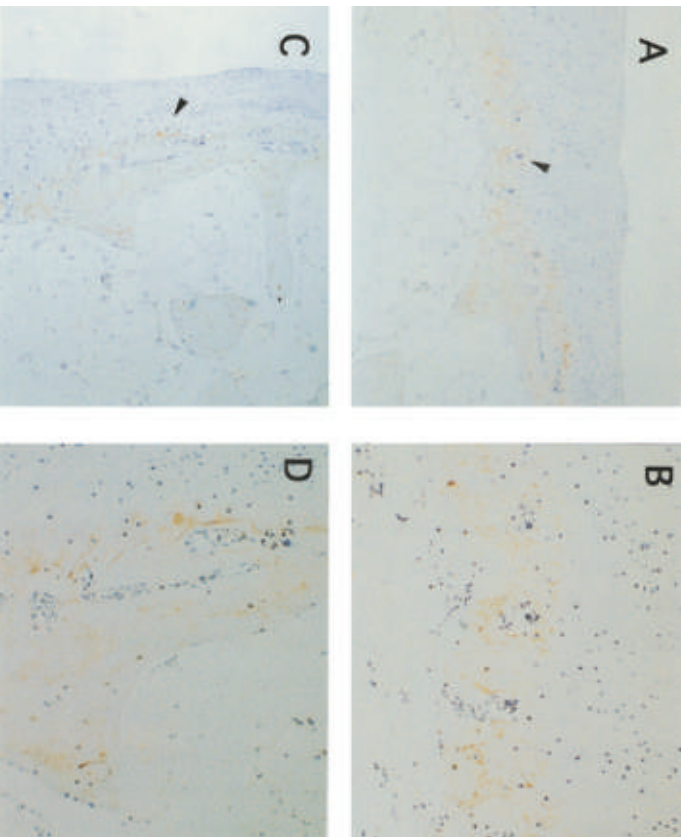


Fig. 9. Immunohistochemical staining with anti TGF- β antibodies (A, C; $\times 33$, B, D; $\times 66$). Positive staining with anti TGF- β antibodies is observed in the interterritorial regions of the deep zone of the cartilage-like tissue in both transition (A; arrow-head, B) and developed osteochondrophyte segments (C; arrow-head, D).

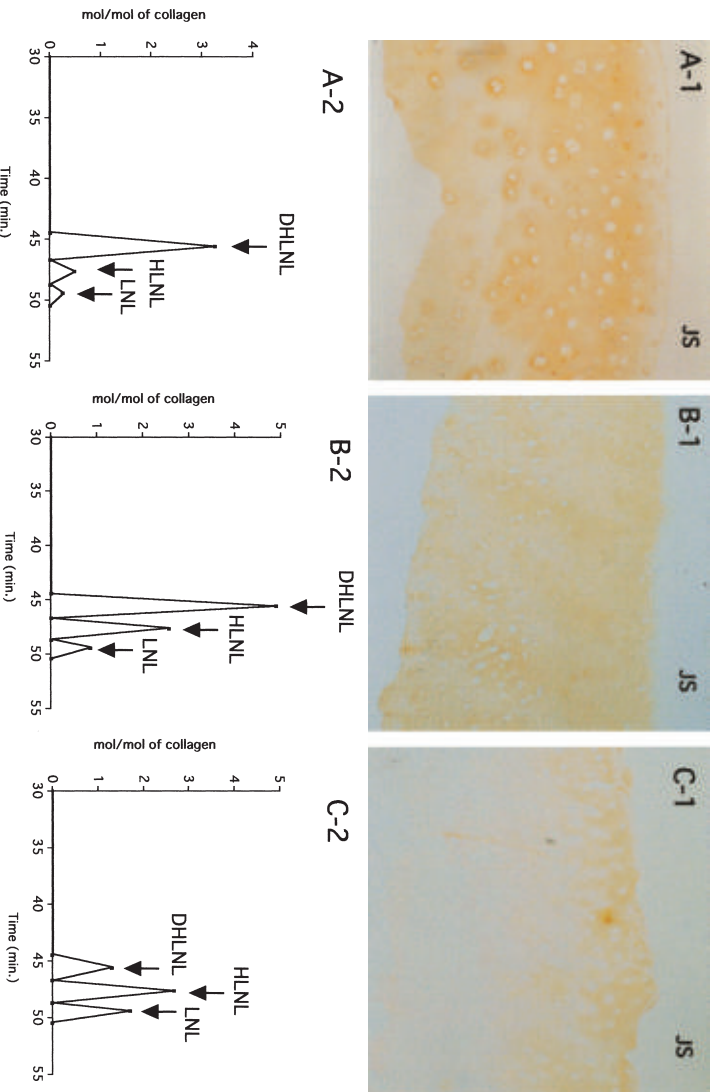


Fig. 10. Anti-type II collagen staining (A-1, B-1, C-1) and chromatographic patterns (A-2, B-2, C-2) of normal (A), moderately degenerated (B) and severely degenerated (C) articular cartilage.

DHLNL, dihydroxylysionorleucine
HLNL, hydroxylysionorleucine
LNL, lysionorleucine

ストレスや周囲の環境の異常に対してその基礎代謝を変化することで対応するとともに、その細胞数を増加させクラスターを形成する⁹⁾。しかし、変性が進行していくと、基礎代謝の変化で対応しきれなくなった細胞は減少し関節軟骨に生じた亀裂は軟骨基質の深部へ達してしまい tide mark の重層化が出現する¹⁾。さらに、この時期になると、OAの軟骨下骨には増殖性反応と呼ばれる変化が生じてくる。すなわち、関節軟骨基質の荷重緩衝能力の低下により軟骨下骨に微小骨折が生じ、その修復機転としての軟骨下骨の硬化とともに、関節辺縁の非荷重部にはO-Cが形成される。こうした増殖性変化の一つと考えられるO-Cの発生機序については、1953年にHarrison¹⁵⁾が、変形性股関節症のO-Cにおいては変性した関節軟骨内に extracapital vascularisation あるいは intracapital vascularisation により血管が侵入

し、内軟骨性骨化が起こって形成される可能性があることを報告した。さらに、1976年にはBombelli¹⁶⁾が、変形性股関節症のO-Cは骨頭および寛骨臼における plastic deformity と靭帯、滑膜、関節包に加わる張力の結果生じる可能性を、また、二宮ら¹⁷⁾は、動物実験から、既存の関節軟骨表面を線維組織が被い、ここに硝子軟骨が形成され、続いて血管が侵入して内軟骨性骨化が起こるといったO-Cの形成過程の存在を報告した。また、1988年、岩崎ら¹⁸⁾¹⁹⁾は、変形性股関節症のO-Cの組織像の検討から、O-Cは、3つのパターン、すなわち、既存の関節軟骨に起る内軟骨性骨化と、線維組織より化生した軟骨内に起る内軟骨性骨化、さらに関節軟骨の終末部にみられる膜性骨化より発生し進展する可能性のあることを指摘している。以上のように、これまで、OAにおけるO-Cの形成機序を探るいくつかの研究がなされてきたが、O-C

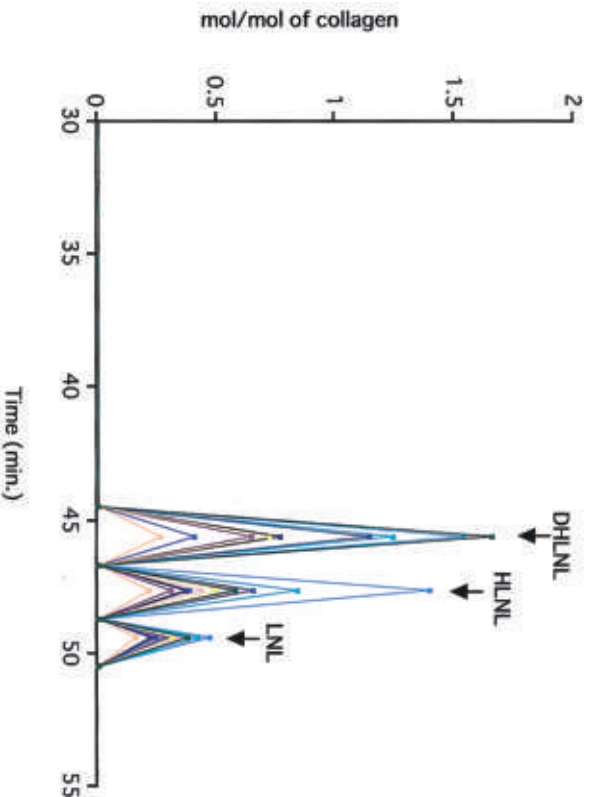


Fig. 11. Chromatographic patterns of osteochondrocyte
 DHLNL, dihydroxylysinoxonoleucine
 HLNL, hydroxylysinoxonoleucine
 LNL, lysinoxonoleucine

Table 1. DHLNL/HLNL rates of osteochondrocytes, normal and osteoarthritis cartilages

	DHLNL/HLNL rates (mean±SD)	
Normal cartilages	6.71±0.52	$p < 0.01$
Degenerated articular cartilages (osteoarthritis)	1.48±0.26	$p < 0.01$
Osteochondrocytes	1.42±0.19	

DHLNL : dihydroxylysinoxonoleucine
 HLNL : hydroxylysinoxonoleucine
 Normal cartilages ($n=2$)
 Degenerated articular cartilages ($n=5$)
 Osteochondrocytes ($n=10$)

の形成に際して、実際に、関節軟骨のいかなる構成成分にどのような化学的变化が始まるものであるかについて詳細に検討した報告はなされてはいない。そこで、著者は、この点を明らかにする目的で、まず、O-Cが最も旺盛に発育していると考えられるその基部の変化について種々の抗体を用いた免疫組織化学的検索を行った。O-Cの骨側基部についてみると、その表層は抗I型コラーゲン抗体で染色される線維性結合組織で被われており (Fig. 2-A, C)、石灰化層との境界には吉本法で染色される類骨 (Fig. 3) が観察された。しかし、O-

Cの骨側基部の細胞間基質は、軟骨基質であるII型コラーゲンおよび軟骨型プロテオグリカンに対する抗体ではほとんど染色されなかつた。このことから、O-Cの基部骨側では、主として膜性骨化によりO-Cの形成と増大が生じているものと考えられる。一方、O-C基部関節腔側では、その表層は、抗I型コラーゲン抗体で染色される線維性結合組織で被われていた (Fig. 5-A)。しかし、関節辺縁にみられる健常軟骨から変性軟骨への移行部および、隆起状にO-Cが立ち上がる部位の基質は、サフラニンO染色でオルトクロマジーを示し

(Fig. 4-D), 抗 II 型コラーゲン抗体 (Fig. 5-D) ならびに抗プロテオグリカン抗体 (Fig. 6-A, D) で染色された。このことから, O-C 基部関節腔側では, 軟骨基質が合成されており, こうした軟骨様組織を経て骨化に至る過程が生じていると考えられる。しかし, 関節辺縁の変性軟骨から骨棘への移行部中間層の基質と同部から隆起状に立ち上がる部位の基質では性状が異なることが示唆された。すなわち, 両部位間では, サフラニン O 染色によるオルトクロマジーの出現の仕方に変差が認められた (Fig. 4-E, F)。さらに, 変性軟骨から O-C への移行部中間層の細胞間基質は, 抗 II 型コラーゲン抗体 (Fig. 5-E) のみならず抗 I 型コラーゲン抗体に対するわずかな染色性を示すほか (Fig. 5-B), 同部には存在する細胞数も多く, これらの細胞領域は, II 型コラーゲン (Fig. 5-E) ならびに軟骨型プロテオグリカンに対する抗体で強く染色された (Fig. 6-B, E)。これに対して, 隆起状に立ち上がる部位の細胞間基質には, 均一な抗 II 型コラーゲン (Fig. 5-F) および抗プロテオグリカン抗体 (Fig. 6-C, F) による染色性が認められるものの, I 型コラーゲンの存在は認められなかった (Fig. 5-C)。さらに, 同部位に存在する細胞数はわずかで, これらの細胞領域には, II 型コラーゲンならびに軟骨型プロテオグリカンに対する抗体による染色性を認めるものの, その染色性に, 細胞間基質に比べより強いといった傾向は観察されなかった (Fig. 5-F, 6-C, F)。以上のことから, O-C 基部関節腔側において, 関節辺縁の変性軟骨から O-C への移行部の基質には, 線維軟骨様の組織が, さらに同部より隆起状に立ち上がる部位の基質には硝子軟骨様組織が存在するものと考えられる。また, 関節辺縁の変性軟骨から O-C への移行部では, 細胞数の増加と細胞領域での抗 II 型コラーゲン抗体ならびに抗軟骨型プロテオグリカン抗体による強い染色性とともに, その細胞間基質には, 抗 MMP-1 抗体ならびに抗 MMP-3 抗体による染色性が観察された (Fig. 7-A, C)。したがって, 同部の線維軟骨様組織では, 旺盛な軟骨様基質の合成と分解が同時に進行しているものと推察される。このように, O-C 基部関節腔側では, 硝子軟骨様ならびに線維軟骨様組織が混在し, 基質の合成と分解が亢進し, やがてその一部から骨化

が生じるものと考えられる。そこで, 次に, これらの軟骨様組織の骨化に関与すると考えられる血管の新生と組織内侵入および TGF- β の局在について検討を行った。その結果, 線維軟骨様組織では石灰化骨組織との境界部に, 硝子軟骨様組織では O-C 先端の骨組織への移行部に抗 CD34 抗体での染色が認められ, こうした部位では硬組織内への微細血管の侵入が生じているものと考えられる。一方, TGF- β に対する抗体を用いた検索では, 線維軟骨様組織の深層の細胞間基質および隆起状の硝子軟骨様組織の先端の骨組織への移行部に染色性が認められた。成長因子の 1 つである TGF- β は, 軟骨細胞の増殖分化に影響を与える重要な因子であるとともに, 骨折修復機転における新生血管の侵入にも関与することが明らかにされている²⁰⁾²¹⁾。van den Berg らは, 本因子をマウスの関節内に投与することにより O-C が形成される事実も報告している²²⁾。このことから, 線維軟骨様組織の深層および硝子軟骨様組織内では, 新生血管の侵入と TGF- β の増加を伴ったいわゆる内軟骨性の骨形成が進行しているものと考えられる。岩崎ら¹⁸⁾¹⁹⁾ は, 組織学的検索から, O-C の表層の性状は ① 硝子軟骨 ② 硝子軟骨と線維軟骨 ③ 線維軟骨 ④ 線維組織の 4 種に分けることができることを, また, Aigner²³⁾²⁴⁾ はコラーゲン抗体による免疫染色と II 型コラーゲンの m-RNA の *in situ* hybridization から, O-C は, 先ず骨膜や滑膜から増殖した未分化な線維性結合組織でその形成が開始され, その後, 線維性軟骨様組織と硝子軟骨様組織が形成されることを報告している。これらの事実と本研究結果を考え合わせると, O-C の基部骨側は線維性結合組織で, 基部関節腔側は, 線維性の結合組織, 線維軟骨様組織, 硝子軟骨様組織, および骨組織の 4 層から構成されており, O-C の形成は, 基部骨側では主として膜性骨化によって, 基部関節腔側では, MMP, TGF- β の出現さらには微細血管の侵入などの多彩な変化を伴って, 既存の関節軟骨内あるいは線維性組織より化生した軟骨内に起る内軟骨性骨化が混在して進展することによって形成されるものと考えられる。

次に, このような O-C の形成におけるコラーゲン代謝面の変化を生化学的に検討するため, O-C

の還元性架橋結合のパターンを分析し、健常軟骨ならびに変性軟骨の分析パターンと比較した結果、O-Cでは、健常軟骨に比べてHLNLLの割合が増加しており (Table 1)、こうした変化は、変性に陥った関節軟骨コラーゲンの還元性架橋結合形成と類似していた (Fig. 10, 11)。これまでの研究より、コラーゲンの還元性、非還元性架橋結合の分布には組織特異性のあることが明らかにされている²⁵⁾²⁶⁾。とくに、骨や象牙質などの硬組織のコラーゲンには主としてDHLNLが、一方、皮膚、腱といった軟組織のコラーゲンには主としてHLNLが存在するため、各組織のHLNLに対するDHLNL量の比はコラーゲンの組織特性を示す重要な指標と考えられている²⁷⁾。このことから、O-Cの骨・軟骨コラーゲンは、本来の骨・軟骨コラーゲンの示す還元性架橋結合の形成パターンというよりは、むしろ、皮膚、腱といった軟組織コラーゲンの形成する還元性架橋結合に類似したものを形成するものと思われる。O-Cは、組織学的にみると、膜性骨化と内軟骨性骨化の両者によりその硬組織としての強度を増加させる機転が働いているものと推察される。このことから、Stokey²⁸⁾, Perryら²⁹⁾は、OAにおいてO-Cが形成されることにより関節の安定性が獲得される可能性を、さらに、伊藤³⁰⁾、平井³¹⁾、堀田³²⁾、岩崎ら¹⁾⁸⁾¹⁹⁾は、O-Cの形成が関節の荷重面として機能してやる可能性のあることを報告し、O-C形成が関節の機能上重要な役割を担うOA関節軟骨の修復機転の1つであることを指摘している。しかし、本研究の結果より、O-Cにおいて形成される軟骨基質は、本来の硝子軟骨とは性状が異なり、線維軟骨との混在の様相を呈するものである。さらに、硬組織コラーゲンの生化学的性状からも、O-Cにおける基質代謝は修復よりはむしろ、コラーゲン線維の物理化学的安定性の低下を示すものであり、O-C形成は関節の骨・軟骨の変性の過程として形成されるにすぎず、O-Cが関節の荷重に対して十分耐え得る組織として存続することは困難と考えられる。

Y. 結 語

1) 変形性関節症において形成される骨棘 (osteochondrophyte) の基質代謝について、免疫

組織学的ならびに生化学的に検討した。

2) O-Cの骨側基部側の細胞外基質のほとんどは線維性結合組織で、抗I型コラーゲン抗体でよく染色されたが、抗II型コラーゲン抗体ならびに抗プロテオグリカン抗体では染色されなかつた。

3) O-Cの基部関節腔側の細胞外基質は、抗I型コラーゲン抗体で染色される線維性の結合組織と骨組織、抗I型、抗II型コラーゲン抗体、抗プロテオグリカン抗体で染色される線維軟骨様組織、さらに、抗II型コラーゲン抗体、抗プロテオグリカン抗体に染色される硝子軟骨様組織4層から構成されていた。

4) O-C基部関節腔側の線維軟骨様組織の深層および硝子軟骨様組織内には、抗CD34抗体で染色される新生血管の侵入と抗TGF- β 抗体による染色性が認められた。

5) O-Cの軟骨コラーゲンの還元性架橋結合形成は、健常軟骨コラーゲンに比べ、HLNLの占める割合が増加し、変性に陥った関節軟骨が示すコラーゲンの還元性架橋結合形成パターンと類似していた。

6) O-Cにおいて形成される軟骨基質は、本来の硝子軟骨とは性状が異なり、線維軟骨との混在の様相を呈するものであった。さらに、硬組織コラーゲンの生化学的性状からも、O-Cにおける基質代謝は修復よりはむしろ、O-C形成は関節の骨、軟骨の変性の過程として形成されるものと考えられる。

7) 以上のことから、O-Cが関節の荷重に対して十分耐え得る組織として存続することは困難であるものと考ええる。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜わりました東京慈恵会医科大学整形外科講座藤井克之教授に深謝いたします。また、研究に際し、分析手技の御指導をいただきました同講座辻美智子講師に心よりお礼を申し上げます。

文 献

- 1) Mankin HJ. Biochemical changes in articular cartilage in osteoarthritis. A.A.O.S. Symposium on Osteoarthritis. St. Louis: C.V. Mosby; 1976. p. 1-22.

- 2) 新名正由, 舛田浩一. 関節軟骨の破壊と再生. 骨・関節・軟帯 1989; 2: 137-48.
- 3) Ehrlich MG, Houle PA, Virgiani G, Mankin HJ. Correlation between articular cartilage collagenase activity and osteoarthritis. Arthritis Rheum 1978; 21: 761-6.
- 4) Okada Y, Gonoji Y, Nakanishi I, Nagase H, Hayakawa T. Immunohistochemical demonstration of collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) in synovial lining cells of rheumatoid synovium. Virchows Arch[B] 1990; 59: 305-12.
- 5) Woessner JF Jr, Selzer MG. Two latent metalloproteinases of human articular cartilage that digest proteoglycan. J Biol Chem 1984; 259: 3633-8.
- 6) 越野富久. 膝診療マニュアル, 第2版. 東京: 医歯薬出版; 1988. p.166.
- 7) Mankin HJ. Current concepts review: the response of articular cartilage to mechanical injury. J Bone Joint Surg 1982; 64-A: 460-6.
- 8) Dean DD, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Howell DS, Woessner JF Jr. Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. J Clin Invest 1989; 84: 678-85.
- 9) 窪川経茂. 変形関節症における関節軟骨の破壊機構に関する研究. 日整外会誌 1994; 68: 415-25.
- 10) 河原 元. 類骨の染色, 新染色法のすべて. 東京: 医歯薬出版; 1999. p.130-1.
- 11) Fujii K, Kuboki Y, Sasaki S. Aging of human bone and articular cartilage collagen: changes in the reducible cross-links and their precursors. Gerontology 1976; 22: 363-70.
- 12) Saito M, Maruno K, Fujii K, Ishioka N. Single column high-performance liquid chromatographic-fluorescence detection of immature, mature and senescent crosslinks of collagen. Anal Biochem 1997; 253: 26-32.
- 13) Kuboki Y, Shimokawa H, Ono T, Sasaki S. Detection of collagen degradation products in bone. Calcif Tissue Int 1973; 12: 303-12.
- 14) Bornstein P, Piez KA. A biochemical study of human skin collagen and the relation between intra- and intermolecular cross-linking. J Clin Invest 1964; 43: 1813-23.
- 15) Harrison MHM, Schajowics F, Trueta J. Osteoarthritis of the hip: A study of the nature and evolution of the disease. J Bone Joint 15. Bombelli R. Osteoarthritis of the hip. Berlin: Springer-Verlag; 1976.
- 16) Bombelli R. Osteoarthritis of the hip. Berlin: Springer-Verlag; 1976.
- 17) 二宮節夫, 富永 豊. 変形性関節症の進展—組織学的および力学的考察. 臨整外 1979; 14: 10-6.
- 18) 岩崎勝郎. 変形性股関節症の自然経過; 特に骨棘の変化を中心として. 日本医事新報 1987; 3295: 16-20.
- 19) 岩崎勝郎. 変形性股関節症における骨棘の組織像よりみた発生と機能. Hip Joint 1988; 14: 315-9.
- 20) Joyce ME, Jingsushi S, Bolander ME. Transforming growth factor-beta in the regulation of fracture repair. Orthop Clin North Am 1990; 21: 199-209.
- 21) Jingsushi S, Joyce ME, Bolander ME. Basic fibroblast growth factor in rat fracture healing. Orthopedic Transactions 1993; 17: 713.
- 22) van den Berg WB. Cartilage destruction and osteophytes in instability-induced murine osteoarthritis: Role of TGF- β in osteophyte formation. Agents Actions 1993; 40: 215-9.
- 23) Aigner T. Independent expression of fibril-forming Collagens I, II, and III in chondrocytes of human osteoarthritic cartilage. Lab Invest 1993; 91: 829-37.
- 24) Aigner T. Differential expression of collagen type I, II, III, and X in human osteophytes. Lab Invest 1995; 73: 236-43.
- 25) Kuboki Y, Takagi T, Sasaki S, Saito S, Machanic GL. Comparative collagen biochemistry of bovine periodontium, gingiva, and dental pulp. J Dent Res 1981; 60: 159-63s.
- 26) Fujii K, Yamagishi T, Nagafuchi T, Tsuji M, Kuboki Y. Anatomical and biochemical characteristics of human meniscofemoral ligaments. Knee Surg Spors Traumatol Arthrosc 1994; 2: 229-33.
- 27) 斉藤 充. ヒトの荷重・非荷重骨におけるコラーゲンの生化学的特性とその加齢変化. 慈恵医大誌 1999; 114: 327-37.
- 28) Storey GO, Landells JW. Restoration of the femoral head after collapse in osteoarthritis. Ann Rheum Dis 1971; 30: 406-12.
- 29) Perry GH, Smith MJG, Whiteside CG. Spontaneous recovery of the joint space in degenerative hip disease. Ann Rheum Dis 1972; 31: 440-8.

- 30) 伊藤鉄夫, 赤星義彦, 森 英吾, 藤川重尚, 加藤 実, 野坂健次郎. 変形性関節症の病変進展のレ線学的研究. 臨整外1968; 3: 2-14.
- 31) 平井和樹, 加藤哲也, 伊藤邦臣, 増田武志, 深沢雅則, 薄井正道. 変形性関節症の自然臼蓋形成について. 臨整外1980; 15: 575-9.
- 32) 堀田芳彦, 松井健郎, 中田代助, 東 博彦. 変形性における病態の自然修復と臼外上縁の骨棘形成について. 整形・災害外科1984; 27: 483-9.