

Loose shoulder の関節包における コラーゲンの生化学的分析

昭和大学藤が丘病院整形外科

平 川 誠・山 本 龍 二
三 原 研 一・今 里 有紀彦
安 楽 岩 嗣・筒 井 廣 明
黒 木 良 克

東京慈恵会医科大学整形外科

藤 井 克 之

Biochemical Study on Collagen from the loose Shoulder Joint Capsules.

by

M. Hirakawa, R. Yamamoto, K. Mihara,
Y. Imazato, I. Anraku, K. Tsutsui,
and Y. Kuroki

Department of Orthopaedic Surgery, Showa University,
Fujigaoka Hospital.

K. Fujii.

Department of Orthopaedic Surgery,
The Jikei University School of Medicine.

The present study was performed to look into the abnormalities of collagen synthesis in joint capsules from patients with loose shoulder. Hydroxyproline was determined to estimate the collagen contents in a neutral salt soluble, acetic acid soluble and insoluble fractions. Insoluble collagen was reduced with NaBH_4 . Hydrolysis of the reduced materials was carried out with 3N HCl for 24h at 110°C in vacuo. Hydrolyzed samples were chromatographed on an Aminex A-5 column with slight modifications. Normal joint capsules of the shoulder joints (ranging from 15 to 45 years of age) were found to contain less collagen compared to other major joints; the amounts of collagen in the tissues were as follows: The shoulder joints; 30-35% per tissue dry weight, the elbow, the hip and knee joints; 80-90% per tissue dry weight. Although there were no significant differences in these values between a normal shoulder and a loose one (8 cases, ranging from 14 to 24 years of age), a significant increase in the amount of neutral salt and acetic acid soluble collagen was observed. Both normal and loose shoulders consisted of mainly type I collagen and of small amounts of type III collagen. Comparative analysis of cross-links of collagen from normal and loose shoulders revealed that collagens from loose shoulders contain more reducible cross-links. These data suggest that joint capsules of loose shoulders produce relatively immature collagen fibers which may partially reflect the clinical features of the disease.

ヒトの loose shoulder (以下 (L-S) の病態を説明していくために、著者らは、まず、正常の四大関節(肩・肘・股・膝)の関節包の主要構成成分であるコラーゲンについて、生化学的な比較分析を行なった。その結果、肩においては、他の関節と比べ、特徴ある結果が得られたので、始めに報告する。

肩関節包の特徴は、まず、組織乾燥重量あたりのコラーゲン含有量は、股・肘・膝の 70~90% に比べ、肩では 30~35% と低値を示した (図 1)。

また、全還元性物質と還元性架橋結合量が、肘と膝では高く、肩と股では低値を示した。しかし、ペプシン可溶性コラーゲン量を求めてみると、肩ではもっとも高く、次いで、肘・膝・股の順であった。このことから、肩関節包のコラーゲンでは、他の関節包に比べ、架橋結合の低形成を来していることが示唆された。そこで、今回、著者らは、この結果を対照として、L-S の関節包コラーゲンについての生化学的分析を行ったところ、興味ある知見を得たので報告する。

研究材料ならびに方法

研究材料には、inferior capsular shift を行った L-S 8 症例 (14~24 歳)、また、対照として、15~45 歳の新鮮死体から、死後少なくとも 5 時間以内に採取した肩関節包を用いた。また、あらかじめ、死亡前に、コラーゲン代謝に影響を及ぼすと思われるような既往疾患がない事を確認した。

関節包からのコラーゲンの分離・精製は、図 2 の方法に準じて行なった。また、酸抽出には、コラーゲン線維の膨潤をさけるために 0.15 M クエン酸 buffer を用いた。

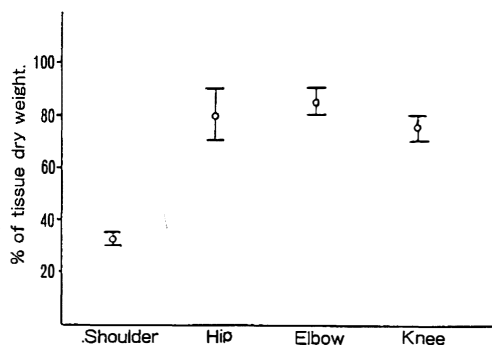


図 1 The amount of total collagen

各組織に含まれるコラーゲン量の測定は、中性塩抽出、酸抽出ならびに不溶性画分における hydroxyproline 量を測定することにより行なった。中性塩および酸抽出により可溶化されたコラーゲン量の測定は、各抽出液における hydroxyproline 量を定量することにより行ない、組織に含まれる全コラーゲン量に対する百分率として表示した。

コラーゲンの還元性物質量の測定は、不溶性コラーゲンを NaB^3H_4 にて還元し、酸加水分解後、分解物の一部について、単位 hydroxyproline 量 (μg) 当りの specific radioactivity (cpm) を求めた。また、還元性架橋結合の分離・同定は、Aminex A-5 カラムを用いて行ない、還元性架橋結合の形成量は、カラムに添加した水解物中に含まれる hydroxyproline 量 (mg) 当りの各架橋結合ピークの radioactivity (cpm) により算出した。

コラーゲン分子種の分析には、不溶性コラーゲンから、ペプシン可溶性コラーゲン、ならびに CNBr ペプチド鎖を調製し、各々についての SDS-PAGE を行

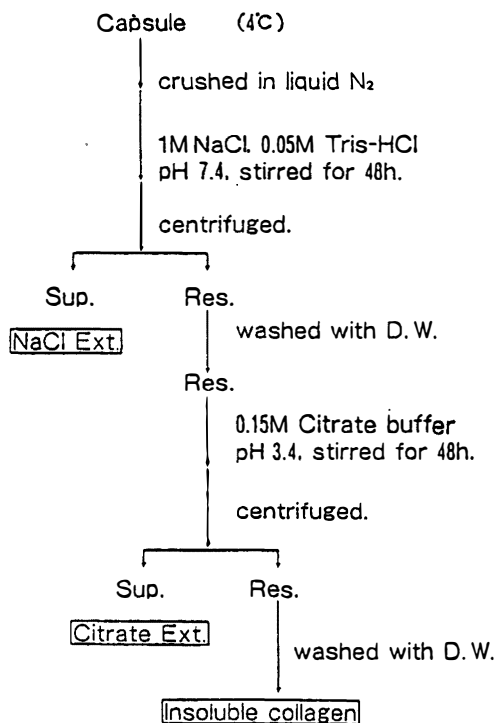


図 2 Extraction of collagen

なった。また、不溶性コラーゲンを酸加水分解後、アミノ酸分析を行なった。

結果ならびに考察

正常、ならびに L-S 関節包の組織湿性重量当りのコラーゲン含有量は、20~40%とほとんど同様な値を示した。次に、中性塩、ならびにクエン酸抽出により可溶化されるコラーゲン量についてみると、正常の 0.4~0.6%に比べ、L-S では 0.5~1.1%とやや高値を示した (図 3)。このことは、L-S 関節包におけるコラーゲン線維の化学的安定性が低いことを示すものである。

このようなコラーゲン線維の安定化には、コラーゲンの分子間に形成される架橋結合が重要な役割りを演ずることが見出されている。そこで、還元性架橋結合の形成量について検討してみると、軟部組織のコラーゲンに特有な架橋結合である lysinonorleucine が正常に比べ、低値を示した (表 1)。また、コラーゲン線維に含まれる全還元性物質量を求めてみると、正常に比べ、L-S では高値を示していた。また、コラーゲン線維にペプシン処理を加えることにより、可溶化されるコラーゲン量を測定してみると、正常に比べ、L-S では多量のコラーゲンが可溶化された。

次に、関節包におけるコラーゲンの分子種について検索した。まず、いずれの試料からも、III型コラーゲンに比較的特異的とされるシスチン残基が全アミノ酸 1000 残基当り、1~2 残基程度が認められた。また、CNBr ペプチド鎖の SDS-PAGE より、いずれの関節包からも III型コラーゲン由来の $\alpha 1(\text{III})\text{CB}_{5+9}$ 鎖が確認された。

ま と め

以上の結果より、L-S 関節包では、正常肩関節包に比べ、全還元性物質量では高値を示したにもかかわらず、還元性架橋結合の形成量は、低値を示した事より、L-S 関節包のコラーゲン線維は前駆体のままで存在

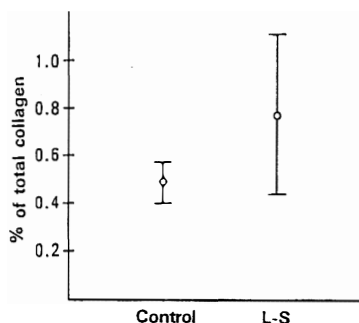


図 3 The amount of total soluble collagen

表 1 Formation of the reducible cross-links

	DiOH-LNL	OH-LNL	LNL	Hist-OH-MD
Control	17167	19133	15582	19946
L-S	10161	17299	8850	18102

The results are expressed as cpm under each cross-link peak/mg of hydroxyproline in the hydrolysates loaded on a column.

Abbreviations: DiOH-LNL, dihydroxylysinonorleucine; OH-LNL, hydroxylysinonorleucine; LNL, lysinonorleucine; Hist-OH-MD, histidino-hydroxymerodesmosine.

している事が伺えた。さらに、ペプシン処理により、多量のコラーゲンが可溶化された事から、L-S 関節包のコラーゲンは、その線維形成にあたり、コラーゲンの分子間架橋結合の低形成を来し、このために多量のコラーゲンが可溶化されたものと推察される。

いずれにしても、L-S 関節包は、正常肩関節包に比べ、比較的幼若なコラーゲン線維を形成していることが判明し、こうした事実は、L-S の病因を考える上で大変興味深い点と思われる。