

氏名(本籍)	^{あさ} 浅 ^り 利 ^{あきら} 晃 (埼玉県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博乙第994号
学位授与年月日	平成6年4月30日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	HISTOCHEMICAL AND MICROCHEMICAL STUDIES OF HYALURONIC ACID IN ARTICULAR CARTILAGE (関節軟骨におけるヒアルロン酸の組織化学的および生化学的研究)
主査	筑波大学教授 医学博士 林 浩一郎
副査	筑波大学教授 医学博士 岡 戸 信 男
副査	筑波大学教授 医学博士 柏 木 平八郎
副査	筑波大学教授 医学博士 庄 司 進 一
副査	筑波大学教授 医学博士 坂 内 四 郎

論 文 の 要 旨

〈目的〉

関節軟骨は硝子軟骨であるが、軟骨表面からの深さで軟骨を構成する軟骨細胞の密度や形態、コラーゲン線維の太さおよび方向などが異なることが知られている。軟骨のグリコサミノグリカン (GAG) にはコンドロイチン硫酸 (CS)、ケラタン硫酸 (KS)、ヒアルロン酸 (HA) などがある。これまで、関節軟骨において CS と KS の局在は調べられてきたが、HA については知られていないのでこれを明確にするため以下の研究を行った。

〈材料と方法〉

第1部では日本白色家兔関節軟骨を使用した。HA はプロテオグリカンの HA 結合部 (HA-binding region, HABR) と言われる部分と特異的に結合する。採取した関節軟骨を固定後凍結包埋し、凍結切片をビオチン化した HABR と反応させた後ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼを作用させ、ジアミノベンジンで発色させた。またストレプトアビジン-金コロイドを作用させ電顕標本とした。コンドロイチナーゼやトリプシンによる前処置を行った材料を作り、同じ方法で標本を作製した。

免疫組織学的研究として CS, KS およびプロテオグリカンのコア蛋白 (PC) に対するモノクローナル抗体を同様に軟骨に反応させ、SAB 法で染色して標本とした。

生化学的研究として表層、中間層、深層に含まれる HA, CS, KS の濃度を測定し組織染色の結果と比較した。

第2部ではヒト膝関節軟骨における HA の局在を同じようにビオチン化 HABR を用いて光顕および

電顕レベルで観察した。また軟骨各層における HA, CS, KS およびデルマトン硫酸 (DS) の濃度を生化学的に測定した。

〈結果〉

第1部家兎軟骨-HA の染色性は主に軟骨細胞内にあったが、酵素による前処置を行うと全層の細胞外基質特に表層と中間層の境界に強い局在が認められた。一方 CS, KS および PC は中間層から深層に多く認められた。

生化学的分析では HA は表層に、CS は中間層に、KS は深層に高濃度に存在していることが示され、組織染色の結果と一致していた。

電顕的には HA は軟骨細胞の細胞基質あるいは小胞内に認められ、細胞外ではコラーゲン線維上に 72nm の一定間隔で局在していた。このことはプロテオグリカンが HA を介しコラーゲン線維と結合していることを示すものと考えた。

第2部ヒト軟骨-HA は主に軟骨細胞内に認められるのみであったが、コンドロイチナーゼによる前処置で表層、中間層の細胞、細胞間に強い染色性が認められ、一方トリプシンによる前処置では中間層から深層にかけて強くなる染色性があり、両者を作用させると染色性は消失した。

生化学的分析では HA および DS は中間層に、CS および KS は深層に高濃度に存在することが示された。以上のことから HA は中間層の細胞で合成分泌が盛んであると考えられた。

電顕的には HA は軟骨細胞では小胞内に、細胞外基質ではコラーゲン線維上あるいは線維間に認められた。

家兎とヒトでは軟骨各層での HA の濃度、酵素作用後の染色性、電顕による細胞外基質での HA の存在部位などが主な違いであった。

審 査 の 要 旨

HA は関節液に含まれるグリコサミノグリカンで関節の潤滑、関節軟骨の栄養などに広く関与しているとして近時注目されている。しかし関節液中の HA は関節滑膜に由来するものとされ、関節軟骨における HA の産生、その局在、機能などについては報告が乏しい。

本研究はその軟骨中の HA の局在性を調べそれにより産生される部位を探り、また電顕により観察を行いそこから HA の機能について考察したものである。

その結果関節軟骨にあっては HA は中間層の細胞で産生が盛んであること、プロテオグリカンが HA を介してコラーゲンと結合していること、家兎とヒトでは HA の濃度や酵素で前処置したときの染色性が異なることなどが明らかになった。

これらの結果は関節の生理的機能を支える関節軟骨の基礎的な構成とその代謝の一面を明らかにしたものであり高く評価される。また家兎とヒトでのこの面での違いを指摘したことは今後の実験的研究にあたって貴重な参考となるものと考えられる。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。