

機械的ストレスによる軟骨障害に対するヒアルロン酸の軟骨保護作用

三木 良久

近畿大学医学部整形外科教室

抄 録

変形性関節症の治療薬としてヒアルロン酸 (hyaluronan, HA) の関節内注入療法が広く使用されている。しかしその作用機序については不明な部分が多い。我々の研究室では以前より変形性関節症の病因に、局所における機械的ストレスが重要な影響を及ぼすことを報告するとともに、活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) がその情報を伝達することを明らかにしてきた。そこで本研究では、機械的ストレスを軟骨組織に与えた時の軟骨代謝に対する HA の作用を検討することにした。すなわちウシ関節軟骨組織に圧迫負荷を加え、基質合成能・ROS の産生などを計測した。その結果軟骨組織に対する圧迫負荷は、まず軟骨細胞における基質合成能を抑制し、ROS 産生を亢進させた。しかし HA は基質合成能を回復させるとともに、ROS 産生を明らかに抑制した。したがって、HA は抗酸化作用を発揮することにより、軟骨保護作用を有することが示された。

Key words: 関節軟骨, ヒアルロン酸, 機械的ストレス, 活性酸素種

緒 言

変形性関節症は、運動器において最も頻度の高い疾患の一つである。患者の ADL・QOL を著しく低下させるため、高齢社会を迎え大きな社会的問題となっている。本疾患は関節軟骨を中心とした関節構成体における、退行性および進行性病変が混在した、慢性かつ進行性の疾患である。その原因としては加齢、全身的因子、遺伝的素因などがあるが、最も影響を及ぼしているのは機械的ストレスである。機械的ストレスが生体に及ぼす影響として、Wolff の法則が知られている。即ち、荷重部の骨量は増加するが、非加重部の骨は徐々に吸収される¹。軟骨や血管、筋肉などでも、力学的な影響を受けてその機能や構造が変化することが明らかになりつつあるが、その詳細は不明である。

関節軟骨は主として軟骨細胞と細胞外基質で構成されている。細胞外基質には 2 種類の主要構成成分がある。1 つは線維成分で、II, IX および XI 型などの軟骨特有のコラーゲンから成り、軟骨に剛直性を与えている²。もう 1 つは軟骨細胞より生産されたプロテオグリカン (proteoglycan, PG) で、分子量約

22 万のコア蛋白にグリコサミノグリカン (glycosaminoglycan, GAG) であるコンドロイチン硫酸鎖およびケラタン硫酸鎖が共有結合し、分子量は計 220 万におよぶ。PG は強い保水力を有しており、荷重に対して水分の出し入れを行い関節軟骨特有の粘弾性を保持している。また PG はヒアルロン酸 (hyaluronan, HA) とリンク蛋白を介して結合することより、巨大なプロテオグリカン会合体 (proteoglycan aggregate) を形成する^{3,4,5}。

活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) は酸素が代謝される過程で体内に生じる物質で、スーパーオキシドアニオン (superoxide anion: O_2^-)、ヒドロゲンパーオキシド (hydrogen peroxide: H_2O_2) などが知られている。スーパーオキシドアニオンに対する中和作用を発揮するスーパーオキシドジスムターゼ (superoxide dismutase, SOD) などの抗酸化物質の働きが十分でない組織障害が生じる。近年、老化・癌・動脈硬化・リウマチなど多くの疾患において ROS の関与が示唆されているが⁶、変形性関節症の発症に対する ROS の関与についての報告は、ROS による軟骨破壊の促進²⁴ など少数報告されているのみであり、またその詳細なメカ

ニズムは解明されていない。ROSとして、広義には一酸化窒素 (nitric oxide: NO) も ROS に含まれ、NO とスーパーオキシドアニオンが反応することで、パーオキシナイトライト (peroxynitrite: ONOO⁻) が形成される。

我々の研究室ではこれまで局所における機械的ストレスが、変形性関節症発症に重要な因子と考え研究を重ねてきた⁷。最初にコンピューター制御により任意の条件で細胞に周期的牽引負荷を加えることが出来る Flexer-cell Strain Unit を導入し検討した^{8,9}。その結果、軟骨細胞に対する軽度の負荷は PG 合成能を増加させ、逆に高度の負荷はそれを低下させるという知見を得た¹⁰。また軟骨組織に対して周期的圧迫負荷を加えることの出来る Biopress system (Flexercell[®] Compression Plus[™] System, FX-4000C[™]) を用い、軟骨組織への周期的圧迫負荷においても軽度の負荷は PG 合成能を増加させ、逆に高度の負荷はそれを低下させるという知見を得た¹¹。さらに圧迫負荷により ROS が産生され、抗酸化薬であるエプセレンによって ROS を抑制すると PG 合成能が回復することも報告した¹¹。この結果により ROS による PG 合成抑制効果が示唆された。

HA が臨床に使用されるようになってから20年以上が経過しており、その臨床的な有用性は明らかである。しかし、HA が変形性関節症に対して真に軟骨保護作用を有しているかどうかは不明である。そこで、本研究では機械的ストレスによって生じる PG 合成能の変化と ROS 誘導を HA が修飾するかどうかを検討することを目的とした。

材料と方法

軟骨の器官培養

ウシ (生後10ヶ月) の関節軟骨を前足部 MP 関節より無菌的に採取した。この際フェザー (大阪) の10番剪刀を用い、用手的に関節面から直径5mmの範囲を全層軟骨として切り出した。シャーレ上、10% ウシ血清 (HyClone, US) 添加 Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco, US) にて平衡状態に達するまで27°Cで5% O₂ 飽和水蒸気圧の条件下で3日間培養した。

軟骨組織に対する周期的圧迫負荷

器官培養した軟骨を Flexercell[®] Compression Plus[™] System, FX-4000C[™] 専用の各ウェルに1個入れ圧迫を加えた。このシステムはコンピューター制御の空気圧にてシリコンの膜を押し上げ、検体にピストンとプレート (Biopress[™] culture plates) 間で任意の圧力と周期の圧迫を加えるシステムである (Flexercell International, Hillsborough, NC)¹²。

蛍光 HA を用いた HA の軟骨への浸潤の観察

蛍光標識された HA (分子量170万, 中外製薬より提供) を血清無添加培養液中に100 µg/ml の濃度で添加し、ウシ関節軟骨に圧迫負荷 (3.4 MPa, 0.5 Hz, 0.5~12時間) を加え、6 µm の厚さで表層から深層へ垂直に切り出した凍結切片を風乾し、標本を作製した。これをレーザー顕微鏡 LSM5 PASCAL Laser Scanning Microscope (200 mW アルゴンレーザー ZEISS) を用い487 nm で励起し、525 nm の FITC フィルターで観察した。

PG 合成能の観察

血清無添加培養液中にウシ関節軟骨を入れ、異なる濃度 (30, 100, 1000, 3300 µg/ml) の HA (分子量190万, 中外製薬より提供) を添加し、周期的圧迫負荷 (3.4 MPa, 0.5 Hz, 12時間) を加えた。処理後のウシ関節軟骨を3回洗浄後、血清無添加培養液に [³⁵S] 硫酸185 KBq/ml (PerkinElmer, US) を添加し、4時間培養した。その後培養液を吸引し、軟骨片を Phosphate-Buffered Saline (PBS) で3回洗浄後パパイン (300 µg/ml, SIGMA, US) を添加し、48時間65°Cの条件化で振盪させて処理した。2.0 ml の可溶分画分に Cetylpyridinium Chloride Monohydrate (CPC, SIGMA, US) (10%) 0.2 ml を加え、室温で30分間振盪し反応させた。フィルター (Whatman GF/F) で沈殿物を回収し、さらに1% CPC で5回洗浄した。フィルターを白熱灯下で乾燥させ、エコノフロー (デュポン) 5 ml を加え、液体シンチレーションカウンターを用いて放射活性を測定した¹³。さらに培養液2.0 ml に CPC (10%) 0.2 ml を加え沈殿物を回収し、培養液中に漏出した PG を同様の方法で測定し、HA の濃度による違いを比較した。

培養液中の ROS の観察

血清無添加培養液中にウシ関節軟骨を入れ、異なる濃度 (1.0, 2.0, 3.3, 5.0 mg/ml) の HA を添加し、周期的圧迫負荷 (3.4 MPa, 0.5 Hz, 2時間) を加えた。処理後の培養液中の活性酸素は活性酸素・フリーラジカル自動分析装置 FRAS4 (Wismer-ll) を用いて測定し、HA の濃度による違いを比較した。この装置は検体中のヒドロペルオキシド濃度を呈色反応で計測し、酸化ストレス度の状態を総合的に評価するものである。その仕組みは、呈色クロモゲン, N,N ジエチルパラフェニレンジアミンがフリーラジカルにより酸化され、無色から赤紫色のラジカル陽イオンになる。これを光度計で計測し、ヒドロペルオキシドの量を定量化し、結果の単位は U. CARR というこの装置特有の単位で表示される¹⁴。組織中の ROS の観察

血清無添加培養液中にウシ関節軟骨を入れ、異なる濃度 (100, 1000, 3300 µg/ml) の HA を添加し、圧迫負荷 (3.4 MPa, 0.5 Hz, 2時間) を加えた軟骨片を 96well プレートにそれぞれ 1 枚ずつ入れ、蛍光色素である 5-(and-6)-chloromethyl-2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H₂DCFDA, invitrogen, US) を 5 µM の濃度で 15 分間処理した。検体を Wallac ARVO™ MX-2 1420 MULTILABEL COUNTER (Perkin Elmer) を用い 485 nm で励起し、535 nm で検出を行った。ウェスタンブロットティングによるニトロチロシンの定量

ニトロチロシンは、生体内タンパク質のチロシン残基がニトロ化されたものであり、生体内における炎症、一酸化窒素 (NO) の産生と関連する。NO はスーパーオキシドと反応し、パーオキシナイトライト (ONOO⁻) を生じる。パーオキシナイトライトはその反応性の高さにより関節軟骨の退行性変化に深く関係していると報告されている^{22,23}。しかし、生体内のパーオキシナイトライトを直接計測することは困難である。そこで、パーオキシナイトライトがアミノ酸のチロシン残基をニトロ化し、ニトロチロシン (nitrotyrosine) を生成することに着目し、酸化ストレスの示標としてニトロチロシンの測定を行った。本研究では、蓄積された酸化ストレスの定量を目的に、ウェスタンブロットティングを用いてニトロチロシンの検出を行った。

血清無添加培養液中にウシ関節軟骨を入れ、HA (100 µg/ml) を添加し、圧迫負 (3.4 MPa, 0.5 Hz, 3時間) を加えた。処理後の軟骨片は、9 M Urea, 30 mM DTT から組成されるサンプリングバッファ 1 内に保存し、マイクロホモジェナイザーを用いて破碎した。その後、等量のサンプリングバッファ 2 (Sampling Buffer solution; WAKO 社, #196-11022) と混和し、100°C で 5 分間加熱した。続いて、15,000 rpm, 4°C で 10 分間遠心し、上清を分離、検体とした。ニトロチロシンは、SDS-PAGE 後にウェット式の転写を行い、化学発光試薬を用いて検出した。詳細な方法を以下に示す。上記の検体 10 µl を 10% アクリルアミドゲル (分離バッファ 6.24 ml, 30% アクリルアミド 3.68 ml, 100 µl 10% SDS, 10% Ammonium persulfite 100 µl, NNNN テトラメチルエチレンジアミン 15 µl) にて 40 mA, 1 時間電気泳動を行い、続いて 100 V, 1 時間の条件で PVDF 膜 (GE healthcare 社, Hybond-P) に転写を行った。転写後の PVDF 膜は洗浄、ブロッキング (ブロックエース; 大日本製薬) に続き、抗ニトロチロシン-モノクローナル抗体 (CALBIOCHEM 社, 希釈倍率 1 :

1000) にて室温で 6 時間震盪しながら一次免疫を行った。その後、0.5% Tween-20 含有 PBS で 3 回洗浄し、Horse Radish Peroxidase (HRP) 標識抗マウス IgG-ヤギ抗体を室温で 1 時間反応させた。反応後、0.5% Tween-20 含有 PBS で 3 回洗浄し、ルミノールと過酸化水素 (ECL Plus Western Blotting Detection System, GE healthcare 社) を用いて化学発光 (ECL) を誘起した。発光は X 線フィルムを用いて検出した。上記により得られたニトロチロシンのバンドは、Model 840/860 Typhoon™ Imager (Amersham Pharmacia Biotech 社) にて数値化、定量を行った。

免疫組織化学 (HRP 標識)

血清無添加培養液中にウシ関節軟骨を入れ、HA (100 µg/ml) を添加し、圧迫負 (3.4 MPa, 0.5 Hz, 3時間) を加えた。処理後の軟骨片は、6 µm の厚さで作製した凍結切片を風乾後、中性ホルマリン (WAKO 社) にて 30 分間固定した。固定処理後、PBS (-) で 10 分間洗浄し、続いて Methanol (WAKO 社) と H₂O₂ (WAKO 社) を 7 : 3 で混合した溶液を加え、30 分間 Quenching 処理を行った。この処理によって細胞内在性のペルオキシダーゼを失活させた。PBS (-) で 3 回洗浄後、スライドをブロックエースに浸し、室温で 60 分間放置することで Blocking 処理を行なった。Blocking 処理後、PBS (-) にて 3 回洗浄した。続いて、10% ブロックエース添加 PBS (-) に 100 倍希釈した抗ニトロチロシンモノクローナル抗体を加え、4°C で 12-16 時間処理することで 1 次抗体処理とした。一次抗体処理後、PBS (-) で 3 回洗浄し 10% ブロックエース添加 PBS (-) に 750 倍希釈した HRP 標識抗マウス IgG-ウサギ抗体 (Santa Cruz biotechnology 社) を加え、室温で 60 分間処理することで 2 次抗体処理を行った。2 次抗体処理後、PBS (-) にて 3 回洗浄し、次に HRP 発色反応を行った。HRP 反応液は、DW 0.5 ml に 50 µl Enhance Orange Buffer Solution [KPL, 71-00-07], 10 µl DAB-C solution [KPL, 71-00-13], 10 µl Peroxidase solution [KPL, 71-00-09] 加えて混合することで調整した。同様の実験区に 2 次抗体処理のみを行い、反応液を加えたものをネガティブコントロールとして使用した。これを光学顕微鏡 BX51 (OLYMPUS) で観察した。

統計学的解析: 各グラフは、複数反復実験より得られた結果の平均値 ± 標準偏差 (mean ± SD) で表した。比較実験区間の統計学的有意差は、JMP (SAS institute Japan) を用いて Tukey-Kramer HSD 多重比較検定を行い、コントロール区 (非圧迫, HA 非添加区) と任意の実験区間の比較は Dunnett test を

用いて行った。尚、それぞれの試験は、one-way ANOVA test を合わせて実施した。

結 果

ウシ関節軟骨に圧迫負荷 (3.4 MPa, 0.5 Hz, 12 時間) を加えた。同時に蛍光標識された HA を添加し、軟骨基質への浸透を検討した。圧迫負荷を加えなかった軟骨では、蛍光標識 HA は軟骨表面 (約20 μm) に留まり、基質内への浸透は観察されなかつ

た。しかし、30分の圧迫負荷 (3.4 MPa, 0.5 Hz) により蛍光標識 HA は軟骨組織深層 (約300 μm) まで浸透し、その後圧迫負荷を継続しても細胞周囲に留まる事が観察された (図1)。

次に、圧迫負荷を加え PG 合成能の変化を観察した。軟骨組織中での PG 新規合成量は圧迫により1/4程度に減少し ($P < 0.01$)、HA の添加はこれを濃度依存性に回復させた ($P < 0.01$)。本実験における最大濃度添加区である3300 μg 添加時には、非添加区

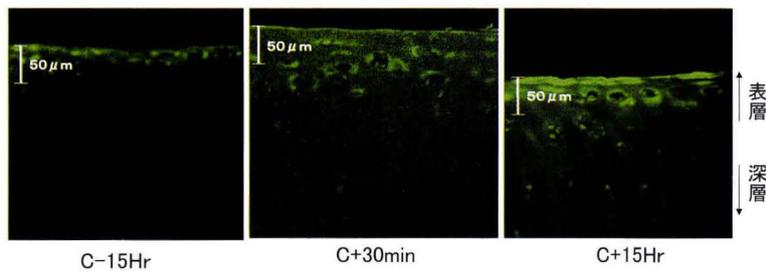


図1 蛍光標識 HA 添加による、HA の軟骨組織への浸透の観察。ウシ関節軟骨に圧迫負荷 (3.4 MPa, 0.5 Hz) を加え、蛍光標識された HA を添加し、軟骨基質への浸透を検討した。C-15 Hr ; 圧迫負荷なし、HA 添加15時間後に観察、C+30 min ; 圧迫負荷あり、HA 添加30分後に観察、C+15 Hr ; 圧迫負荷あり、HA 添加15時間後に観察。スケールバー = 50 μm 。

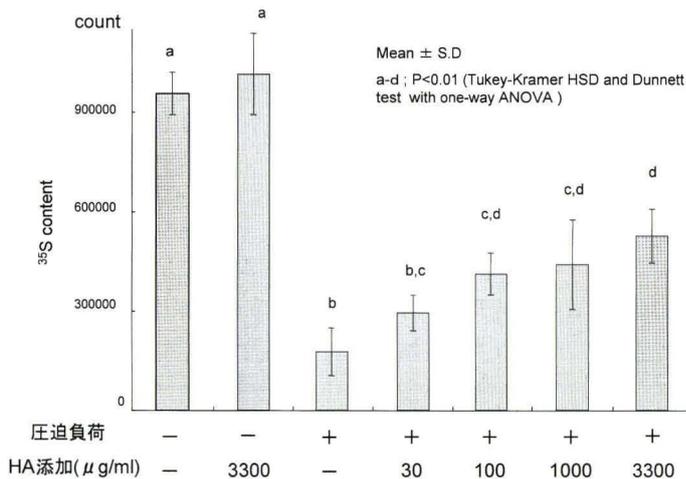


図2 HA 添加による、軟骨中における PG 合成量の変化。ウシ関節軟骨に圧迫負荷 (3.4 MPa, 0.5 Hz, 12時間) を加え、 $[^{35}\text{S}]$ 硫酸の取り込み量を測定することにより軟骨基質の主な成分である PG 合成能の変化を観察した。平均値と誤差範囲 (S.D) を示す ($N=6$)。a, b, c, d ; 異なるアルファベット間において、危険率0.01以下で有意差を認めた。

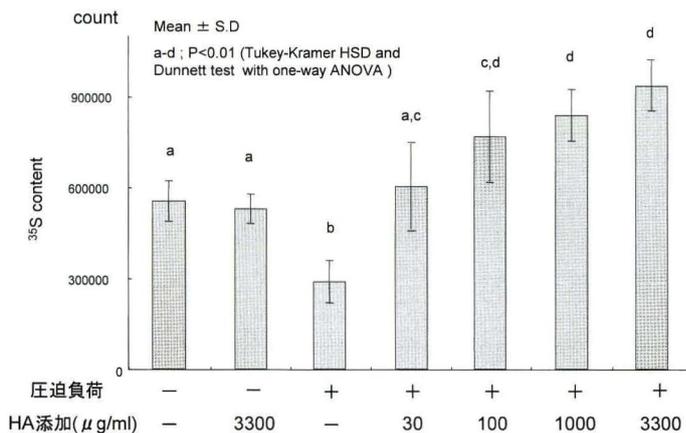


図3 HA 添加による、培養液中における PG 合成量の変化。ウシ関節軟骨に圧迫負荷 (3.4 MPa, 0.5 Hz, 12時間) を加え、培養液中の $[^{35}\text{S}]$ 硫酸の取り込み量を測定することにより、軟骨基質の主な成分である PG 合成能の変化を観察した。平均値と誤差範囲 (S.D) を示す ($N=6$)。a, b, c, d ; 異なるアルファベット間において、危険率0.01以下で有意差を認めた。

とくらべ、PG 合成量が約2.5倍に上昇した (図2)。さらに、培養液中に新規に合成されたPGを定量したところ、軟骨中同様、圧迫負荷による有意な合成量の低下が認められたが、HAを加えることによって濃度依存性に回復した ($P < 0.01$; 図3)。

次にHAの抗酸化作用について検討した。ウシ関節軟骨に圧迫負荷 (3.4 MPa, 0.5 Hz, 2時間)を加え、そこに様々な濃度のHAを加え、培養液中の

ROSを測定した。その結果、統計的有意差は認められなかったが、培養液中のROSは圧迫負荷により、増加傾向が認められた。また培養液中におけるROSの産生に対するHAの中和効果も統計学的有意差は認められなかったものの、濃度依存的に低下させる傾向が認められた (図4)。

続いてウシ関節軟骨に圧迫負荷 (3.4 MPa, 0.5 Hz, 2時間)を加え、蛍光色素CM-H₂DCFDAを

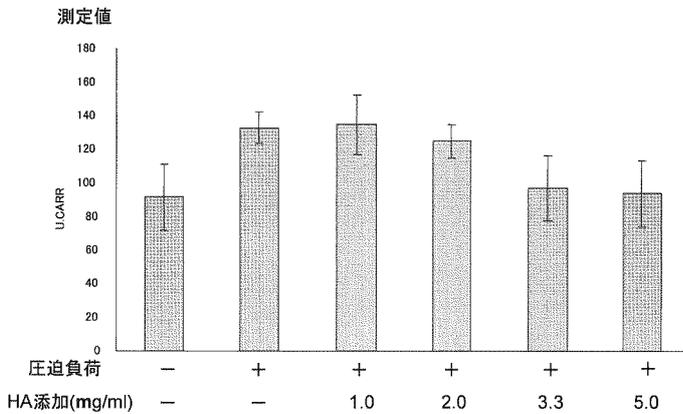


図4 ウシ関節軟骨の圧迫負荷による培養液中の活性酸素種 (ROS) の発生と、HAによるROSの中和効果。ウシ関節軟骨へ圧迫負荷 (3.4 MPa, 0.5 Hz, 2時間)を負荷後、様々な濃度のHAを加え、培養液中のROSを測定した。平均値と誤差範囲 (S.D.)を示す (N=6)。圧迫負荷を加えるとROSの発生は増加傾向を認め、HAの濃度依存性にROSの発生を抑制する傾向を認めた。

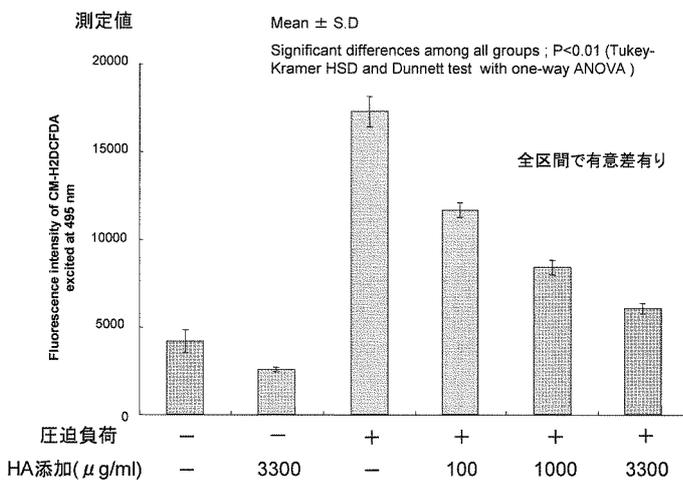


図5 ウシ関節軟骨の圧迫負荷による軟骨中の活性酸素種 (ROS) の発生と、HAによるROSの抑制効果。蛍光色素CM-H₂DCFDAを用い、軟骨組織中におけるROS発生量の測定。軟骨組織に圧迫負荷 (3.4 MPa, 0.5 Hz, 2時間)を加え、軟骨組織中のROSを測定した。平均値と誤差範囲 (S.D.)を示す (N=4)。全実験区間において危険率0.01以下で有意差を認めた。

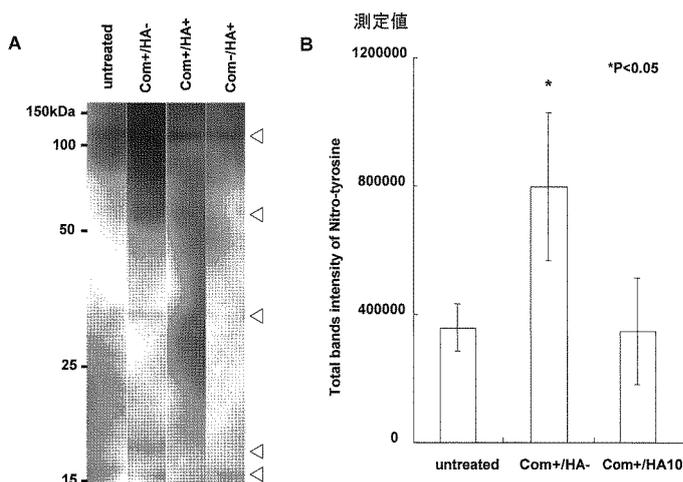


図6 抗ニトロチロシン抗体を用いた、ニトロ化タンパク質の定量。A. 各実験区から得られた軟骨組織を試料としたウェスタンブロット解析の結果。バンドが認められた箇所を矢印で示す。B. デンシトメトリー解析による、ウェスタンブロットの定量化。ウシ関節軟骨に圧迫負荷 (3.4 MPa, 0.5 Hz, 3時間)を加え、ニトロチロシンの産生量を定量した。Com=圧迫負荷, HA=ヒアルロン酸添加 (100 µg/ml) 平均値と誤差範囲 (S.D.)を示す (N=6)。* $P < 0.05$ で有意差を認めた。

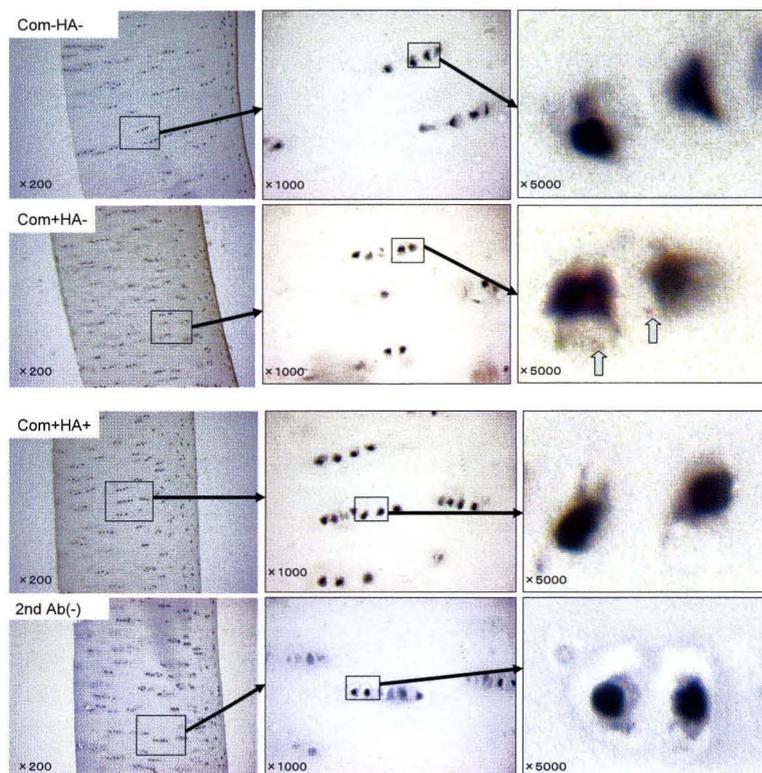


図7 免疫組織化学染色による、ニトロ化タンパク質の観察。
ウシ関節軟骨に圧迫負荷 (3.4 MPa, 0.5 Hz, 3時間) を加え、抗ニトロチロシン抗体を用いた免疫染色によりニトロチロシンの産生を観察した。矢印部に顆粒状に染色されたニトロ化タンパク質の蓄積が認められる。Com=圧迫負荷, HA=ヒアルロン酸 (100 µg/ml)

添加し、軟骨組織中の ROS を測定した。すべての実験区間で有意差を認め ($P < 0.01$)、圧迫負荷により軟骨組織中の ROS は圧迫負荷を加えていないものと比べ約3.5倍に著明に増加し、HA の濃度依存性に明らかに抑制されることが観察された (図5)。

ウェスタンブロットティングによるニトロチロシンの定量をおこなった。その結果、圧迫負荷 (3.4 MPa, 0.5 Hz, 3時間) がニトロ化タンパク質の総量を約2倍に上昇させること ($P < 0.05$)、また、HA 添加 (100 µg/ml) がこれを有意に回復し、非圧迫時と同等の量にまで低下させることが明らかとなった (図6)。

免疫組織化学的にニトロチロシン発現を観察したところ、圧迫負荷 (3.4 MPa, 0.5 Hz, 3時間) によりニトロチロシン (図7矢印の顆粒状に染色された部分) は産生され、HA (100 µg/ml) の添加によって抑制された。

これらにより HA には抗酸化作用があり、抗酸化作用を通じて軟骨保護作用を発揮していることが観察された。

考 察

関節軟骨には血管が無く、軟骨細胞は関節液を介した拡散により、酸素や栄養分を供給されている。この拡散が起こるためには機械的ストレスが重要な役割を担っている。我々の研究室では弱い圧迫負荷

(0.5 MPa) は軟骨の基質合成能を活性化させ、逆に強い圧迫負荷 (2 MPa) を加えると軟骨の基質合成能が低下するという知見を得た¹¹。また、適度な走行を許可した家兎では非負荷の対照と比較して軟骨基質合成能が上昇したという報告¹⁵や、ビーグル犬に1日20 km という過度の走行加えた所、軟骨基質合成能は逆に低下したという報告がある¹⁶。このように適度な機械的ストレスは軟骨の恒常性の維持に不可欠であるが、過度の機械的ストレスは軟骨変性を惹起することが明らかである。そこで今回は3.4 MPa という、器官培養した軟骨組織に強度の機械的ストレスを加え実験を行った所、やはり軟骨基質合成能は低下した。しかしそこに HA を加えると軟骨基質合成能は回復した。今回使用した HA は分子量190万で、現在本邦で使用されている HA の中でも最も分子量が大きい。このような高分子の物質が軟骨基質内に浸透し、軟骨細胞に直接作用することを証明する必要がある。そこで蛍光標識された HA を用い、圧迫負荷を加えると30分という短時間で軟骨組織の深層にまで HA は浸透し、圧迫負荷を継続しても細胞周囲に留まっている事を確認した。これにより HA は細胞に直接作用し、軟骨保護作用を発揮している可能性が示唆された。

HA は関節内では滑膜B細胞が生産する関節液の主成分である。HA の含有量が高いことが関節液における粘弾性の主因となっている。変形性関節症や

関節リウマチなど関節破壊性疾患では、関節液中のHAはその分子量や濃度が低下している。そこでHAを注入することによって、関節液の機能回復が図られるというのがこれまでのHAの作用機序に関する考えである。この他にも、HAには軟骨表層の物理的な保護や運動時の潤滑作用があることが知られている¹⁷。またこのような物理的作用のみでなく、HAは細胞代謝そのものに対する作用を有することも知られており、これまでも、細胞増殖・間葉系細胞から軟骨芽細胞への分化促進^{18,19}、培養軟骨細胞においてPG合成の促進^{13,20}、ROSの誘導の抑制²¹などが報告されている。今回我々は、軟骨組織におけるHAがROS抑制効果をもたらすことを明らかにした。すなわち培養液中に放出されたROSは減少傾向にあり、軟骨組織中のROSはHAにより明らかに減少した。またウエスタンブロット、免疫組織化学によるニトロチロシンの測定を行い、強い機械的ストレスにより誘導されたニトロチロシンをHAは抑制した。前述の通り、ニトロチロシンはタンパク質のチロシン残基がROSの1種であるパーオキシナイトライトによってニトロ化されたものであり、ROS産生の示標となる。よって、このことからHAは強い機械的ストレスにより誘導されたROSを抑制するという一連の結果を得た。

以上より、軟骨に対する強い機械的ストレスに対して、HAは軟骨細胞に対してROSを抑制する抗酸化作用を発揮し、それによって軟骨細胞の基質合成能を回復させることにより軟骨を保護するという働きが明らかとなった。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました浜西千秋教授に深く感謝の意を捧げます。また、研究を遂行するにあたり全般にわたりご指導を頂きました福田寛二教授、ならびにご協力頂いた諸先生方に心から感謝の意を申し上げます。

文 献

- Cullinane DM, Einhorn TA (2002) Biomechanics of Bone. Principles of Bone Biology, 2nd ed, Academic Press, San Diego: p17-32
- Eyre D (2002) Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res* 4: 30-35
- Watanabe H, Yamada Y, Kimata K (1998) Roles of aggrecan, a large chondroitin sulfate proteoglycan, in cartilage structure and function. *J Biochem* 124: 687-693
- Hardingham TE, Fosang AJ, Dudhia J (1990) Domain structure in aggregating proteoglycans from cartilage. *Biochem Soc Trans* 18: 794-796
- 岩田 久, 新名正由編. 関節マーカー. 東京. メジカルビュー社, 1997
- Blake DR, Merry P, Unsworth J, Kidd BL, Outhwaite JM, Ballard R, Morris CJ, Gray L, Lunec J (1989) Hypoxic-reperfusion injury in the inflamed human joint. *Lancet* 1: 289-293
- Tanaka S, Hamanishi C, Kikuchi H, Fukuda K (1998) Factors related to degradation of articular cartilage in osteoarthritis: a review. *Semin Arthritis Rheum* 27: 392-399
- Hara F, Fukuda K, Ueno M, Hamanishi C, Tanaka S (1999) Pertussis toxin-sensitive G proteins as mediators of stretch-induced decrease in nitric-oxide release of osteoblast-like cells. *J Orthop Res* 17: 593-597
- Hara F, Fukuda K, Asada S, Matsukawa M, Hamanishi C (2001) Cyclic tensile stretch inhibition of nitric oxide release from osteoblast-like cells is both G protein and actin-dependent. *J Orthop Res* 19: 126-131
- Fukuda K, Asada S, Kumano M, Otani K, Tanaka S (1997) Cyclic tensile stretch on bovine articular chondrocytes inhibits protein kinase C activity. *J Lab Clin Med* 130: 209-215
- Tomiyama T, Fukuda K, Yamazaki K, Hashimoto K, Ueda H, Mori S, Hamanishi C (2007) Cyclic Compression Loaded on Cartilage Explants Enhances the Production of Reactive Oxygen Species. *J Rheumatol*. 34: 556-562
- Fermor B, Weinberg JB, Pisetsky DS, Misukonis MA, Banes AB, Guilak F (2001) The effects of static and intermittent compression on nitric oxide production in articular cartilage explants. *J Orthop Res* 19: 729-737
- Fukuda K, Dan H, Takayama M, Kumano F, Saitou M, Tanaka S (1996) Hyaluronic acid increases proteoglycan synthesis in bovine articular cartilage in the presence of interleukin-1. *J Pharmacol Exp Ther* 277: 1672-1675
- A Alberti, L Bolognini, D Macciantelli, M Caratelli (2000) The radical cation of N,N-diethyl-para-phenyldiamine: a possible indicator of oxidative stress in biological samples. *Res Chem Intermed* 26: 253-267
- Säämänen AM, Tammi M, Kiviranta, Helmiminen HJ (1988) Running exercise as a modulatory of proteoglycan matrix in the articular cartilage of young rabbits. *Int J Sports Med* 9: 127-133
- Säämänen AM, Kiviranta I, Jurvelin J, Helmiminen HJ, Tammi M (1994) Proteoglycan and collagen alterations in canine knee articular cartilage following 20 km daily running exercise for 15 weeks. *Connect Tissue Res* 30: 191-201
- 馬淵清資, 塚本行男, 小原健男, 山口敏二郎 (1993) 関節の潤滑に及ぼすヒアルロン酸投与の効果. *生体材料* 11: 20-26
- Kawasaki K, Ochi M, Uchio Y, Adachi N, Matsusaki M (1999) Hyaluronic acid enhances proliferation and chondroitin sulfate synthesis in cultured chondrocytes embedded in collagen gels. *J Cell Physiol* 179: 142-148
- Kujawa MJ, Caplan AI (1986) Hyaluronic acid

- bonded to cell culture surfaces stimulates chondrogenesis in stage 24 limb mesenchyme cell cultures. *Dev Biol* 114: 504-518
20. Kikuchi T, Shinmei M (1994) Effects of hyaluronan on proteoglycan metabolism of rabbit articular chondrocytes in cultures. *J Rheumatol* 5: 207-215
21. Fukuda K, Takayama M, Ueno M, Oh M, Asada S, Kumano F, Tanaka S (1997) Hyaluronic acid inhibits interleukin-1 induced superoxide anion in bovine chondrocytes. *Inflamm Res* 46: 114-117
22. Oh M, Fukuda K, Asada S, Yasuda Y, Tanaka S (1998) Concurrent generation of nitric oxide and superoxide inhibits proteoglycan synthesis in bovine articular chondrocytes: involvement of peroxynitrite. *J Rheumatol* 25: 2169-2174
23. Davies CM, Guilak F, Weinberg JB, Fermor B (2008) Reactive nitrogen and oxygen species in interleukin-1-mediated DNA damage associated with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 16: 624-630
24. Henrotin YE, Bruckner P, Pujol JP (2003) The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage* 11: 747-755