

一 般 演 題 抄 錄

13. ウサギ関節軟骨欠損とフリーラジカル

宮城 一郎 菊池 啓 野中 藤吾 嶋田 亘 田中 清介

近畿大学医学部整形外科学教室

フリーラジカルと関節破壊との関連を検討するため、ウサギ膝関節荷重部関節軟骨欠損モデルでの、SO と一酸化窒素 (NO) の関与を経時的に検討した。ウサギの一侧の大腿骨内側顆部荷重面に直径 5 mm の軟骨下骨に達する欠損をドリルにて作製、コントロールとして反対側は関節切開のみとした。術後16週目までの各週の大腿骨内側顆部関節軟骨を、長さ10 mm 巾7 mm にわたり全層で採取し、細切してチップ状とした後、シリンジを応用した装置で、培養液 (MEM) を介して500 g~5 kg の重錘によるメカニカルストレスを10分間加えた。SO の計測には、浜松フォトニクス社製 Argus-50 を使用し、一酸化窒素 (NO) の測定には、Scholar Tec 社製 FES-450 を用いて測定した。培養液中への SO 放出量は、加えたストレス依存性に有意に増加した。また、メカニカルストレスを加えた軟骨組織および MEM 中の SO 量を個別に測定比較検討したところ、メカニカルストレスを加えていない軟骨組織内

の SO 量に比べ、軟骨組織内の SO は、培養液中へ放出されるのみならず、総量として約2倍に増加した。各週後屠殺し得られた関節軟骨組織サンプルを、経時的変化を検討すると、直径5 mm 欠損群では術後1日目から SO は有意に上昇し、特に術後3週目で 37.55 ± 2.26 unit/mg と高値を示した。また、術直後、術後3時間でも両群間に有意差を認めなかった。同サンプルで NO の測定を行ったところ、直径5 mm 欠損群では、術後1日目以降術後3週目にかけて NO 放出量は増加し、術後3週目で 184.3 ± 18.2 digit/mg とピークに達した。SO, NO とも術後4週目では減少し、コントロール群と同程度となり、術後8週、16週目でも2群間に有意差を認めなかった。

正常軟骨組織では、SO, NO はホメオスタシスを保ちながら放出され、瞬時に代謝されていくが、関節破壊が起きるときには、軟骨から発生するこれらのガスメディエーターの放出が共に増加して正常のホメオスタシスが損なわれることがわかった。

14. 正常および RA 軟骨細胞における細胞内カルシウムイオン濃度変化

大江 久之 宗圓 聡 藤田 昌彦 堀越 正智 田中 清介

近畿大学医学部整形外科学教室

RA を含む関節炎においてはさまざまな chemical mediator の放出が確認されている。その中で特に当教室では、軟骨細胞においてヒスタミンが H1 レセプターを介して PKC を活性化し細胞外基質であるケラタン硫酸の合成がヒスタミンの濃度依存性に増加することを報告してきた。

今回我々は、そのヒスタミンの刺激伝達経路について細胞内カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の変化を正常および RA 軟骨細胞にて測定し比較検討した。まず細胞に $5 \mu M$ の Fura2-AM を投与した後、細胞に 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} M のヒスタミン刺激を加え、 $[Ca^{2+}]_i$ の変化を測定した。細胞に励起光を照射し、その蛍光強度の比をハママツホトニクスのアルガス50画像処理装置を用いて測定した。またヒスタミンのレセプター機能を調べるため、H1 レセプターアンタゴニストのクロルフェニラミンと H2 レセプターアンタゴニストのシメチジンをそれぞれ15分前に投与した後、刺激を加え $[Ca^{2+}]_i$ の変化を測定した。各濃度のヒスタミン刺激により dose-dependent な

$[Ca^{2+}]_i$ の上昇が確認された。しかし RA では正常に比べその上昇が少なかった。次に、H2 レセプターアンタゴニストを前投与したときには同じ $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が認められたのに対し、H1 レセプターアンタゴニストを前投与したときには $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が認められず、この刺激伝達は H1 レセプターを介して行われていると考えられた。またヒスタミン刺激による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が GAG 合成に関与しているかを調べるため、カルシウム結合蛋白であるカルモデュリンのインヒビター (W-7) を前投与してヒスタミン刺激後の GAG 合成量を ^{35}S 硫酸を用いて測定した。その結果、いずれの細胞においてもヒスタミン刺激により有為な GAG 合成の増加が認められ、また W-7 を前投与したときにはいずれも GAG 合成の低下が認められた。以上の結果より正常および RA 軟骨細胞においてヒスタミン刺激による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は H1 レセプターを介していると考えられ、RA 軟骨細胞におけるレセプターのダウンレギュレーションが生じていることが示唆された。