

コラーゲン・グルコサミン混合液の摂取によるヒト関節マーカーの改善

清水 宗茂¹⁾ 藤田 浩太郎¹⁾ 市川 淳¹⁾
森松 文毅¹⁾ 向井 直樹²⁾

COLLAGEN AND GLUCOSAMINE HYDRATE SUPPLEMENTATION IMPROVE THE JOINT MARKERS IN HUMANS

MUNESHIGE SHIMIZU, KOTARO FUJITA, JUN ICHIKAWA, FUMIKI MORIMATSU and NAOKI MUKAI

Abstract

The present study was designed to examine the positive impact of collagen and glucosamine hydrate supplementation on joint markers, matrix metalloproteinase-3 (MMP-3), tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) and keratane sulfate (KS). Thirteen healthy fun-runners supplemented collagen and glucosamine hydrate for 30 days. Blood samples were collected on days 0, 15 and 30. The test-drink supplement, however, significantly decreased MMP-3 and KS on days 15 and 30. These results suggest that the supplementation of collagen and glucosamine hydrate may prevent injury and inflammation of joint cartilages and be useful for joint conditions.

(Jpn. J. Phys. Fitness Sports Med. 2004, 53 : 559~566)

key word : collagen, glucosamine, joint marker, matrix metalloproteinase-3, keratan sulfate

I. 緒 言

近年、整形外科領域を中心として関節マーカーに関する研究が発展を遂げている。関節マーカーは、軟骨マトリックス成分とその断片、および軟骨破壊に関与する酵素や阻害タンパク質などに代表される関節病態を特異的に反映する分子指標であり、血液や関節液の分析を通じて、軟骨代謝や関節炎などの関節症状を把握できる。なかでも、至適 pH を中性域に有する Matrix Metalloproteinase-3(以下 MMP-3 と記す)は、プロテオグリカンに限らずコラーゲンの分解および他の MMP の活性化に寄与しており、マトリックス破壊の重要な酵素であること^{1,2)}から、主要な関節マーカーと考えられる。また、Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1(以下 TIMP-1 と記す)は、活性型 MMP と結合しその酵素活性を低下させる

こと³⁾から軟骨破壊の進行に関与する関節マーカーといえる。さらに、ケラタン硫酸(Keratan Sulfate: 以下 KS と記す)は、グリコサミノグリカンの一種で特有の糖鎖配列を有し、その分布は関節軟骨に比較的限定されることから、軟骨破壊を示す関節マーカーであると考えられる。

これまで、運動と関節マーカーに関する研究は KS について検討され、90分間のサッカー試合では血清 KS 値の変化は認められないが、60および80分間走では変化が認められること、さらに、走運動鍛錬者は健常者に比べて安静時血清KS値が高値を示すこと⁴⁾が明らかにされている。また、3,000 m ジョギングを行った場合、肥満度の高い被検者において血清 KS 値が増加を示すこと⁵⁾が報告されている。これらより、関節マーカーは運動により変化する関節部の状態を把握する上で有効な指標といえる。

¹⁾ 日本ハム(株)中央研究所
〒300-2646 茨城県つくば市緑ヶ原3-3

²⁾ 筑波大学大学院人間総合科学研究科
スポーツ医学専攻
〒305-8577 茨城県つくば市天王台1-1-1

Research & Development Center, Nippon Meat Packers, Inc., 3-3
Midorigahara, Tsukuba, Ibaraki 300-2646, JAPAN
Doctoral Program of Sports Medicine, Graduate School of
Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba,
1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8577, JAPAN

一方, スポーツ生理学や栄養学の発展に伴い, 食品中の様々な栄養素が運動に寄与していることが明らかにされてきた。なかでも, 軟骨の構成成分であるコラーゲンおよびグルコサミンに関する研究は, 様々な分野において研究が行われ, 日本や欧米諸国を中心にサプリメントとして利用されている。

コラーゲンは, ヒトをはじめ高等動物を構成するタンパク質のうち, 約1/3を占める線維状タンパク質である。古くから, 結合組織の形成や細胞の足場としての役割は明らかにされてきたが, コラーゲンの経口摂取による血中動態⁶⁾をはじめ, 関節炎の改善効果⁷⁾等の知見が明らかにされたのは最近のことである。一方グルコサミンは, 結合組織や軟骨組織に多く分布するアミノ糖であり, ヒアルロン酸, コンドロイチン硫酸といったグリコサミノグリカンの主成分として, コラーゲンや水分とともに各器官の強度, 柔軟性, 弾力性に寄与していることが知られている。

すでに, グルコサミンの経口摂取により関節軟骨の修復効果⁸⁾, 変形性関節症の予防および治療効果もたらされること^{9~11)}が報告されている。また, 人為的に膝関節軟骨を損傷させた家兎を用いた研究において, コラーゲンの経口摂取が軟骨の修復に有効に働くこと, さらに, コラーゲンおよびグルコサミンの併用摂取がその修復に相乗的に働くこと¹²⁾が明らかにされている。

我々は, コラーゲン・グルコサミン混合液(スポルコプロ コラーゲン&グルコサミン:日本ハム社製)を作製し, 関節部に疼痛を有する競技者を対象に提供している。しかし, 本飲料の機能性を評価するにあたり, 質問紙法により疼痛の変化を検討することはあくまでも主観的評価に過ぎないことから, 関節マーカーを用いた客観的評価が必要であると考えられる。

本研究では, 定期的に走運動を実施している走運動愛好者を対象に, コラーゲン・グルコサミン混合液の継続摂取による関節マーカーの変化を明らかにし, 関節部のコンディショニングに対する本飲料の有効性を検討することを目的とした。

II. 方 法

A. 試験飲料

試験飲料は, 1本(200ml)あたりコラーゲンを200mg, グルコサミンを1,500mg配合した「スポルコプロ コラーゲン&グルコサミン(日本ハム社製)」を用いた。本飲料は, コラーゲンおよびグルコサミンの特有な苦味や渋味を, 甘味料や香料を用いて低減したものである。試験飲料の成分を表1に示した。

B. 被検者およびスケジュール

1. 被検者

被検者は男子大学生13名で, 年齢 22.6 ± 2.7 歳, 身長 171.8 ± 7.2 cm, 体重 60.5 ± 6.0 kg, 10,000mタイム 37.6 ± 2.0 分であった。被検者は, いずれも週3~5日長距離走やトレッドミル等による持久的運動を実施しており, 平均走行距離は週20kmであった。なお, 関節外傷および関節症状の既往を有する者はいなかった。また, あらかじめ被検者には, 本研究の主旨を十分に説明し, ヘルシンキ宣言の勧告に従い被検者の同意を得たうえで試験を実施した。さらに, 本研究計画書は日本ハム株式会社中央研究所倫理委員会に提出され, 同委員会の承認を得て実験が行われた。

Table 1. Nutrients of the test drink containing collagen and glucosamine hydrate.

Nutrient	Content
Water (%)	95.8
Protein (%)	0.1
Lipid (%)	0.0
Ash (%)	0.1
Saccharide (%)	4.0
Crude fiber (%)	0.0
Collagen (%)	0.1
Glucosamine hydrate (%)	0.8
Calories (kcal/100g)	5.0
Sodium (mg/100g)	21.5

2. スケジュール

実験スケジュールを図1に示した。

1) 採血

各種関節マーカーを測定するために、摂取前 (pre), 摂取15日目 (15日), 摂取30日目 (30日) に肘正中静脈より 10 ml ずつ採血した。なお、採血時間は正午とし、午前中は運動を行わず日常生活動作レベルにて採血を行った。採取した血液は常温にて30分静置後、遠心分離 (1,700×g, 10分間) により血清を採取し、測定まで-30℃にて凍結保存した。

2) 群分け

被検者の身体特性および摂取前の各種関節マーカー値をもとに、試験飲料を摂取する摂取群 (7名) および試験飲料を摂取しないコントロール群 (6名) に差のないよう群分けを行った (表2)。摂取群は、1日あたり試験飲料を2本、30日間にわたり摂取させた。なお、すべての被検者に対し、試験期間中におけるプロテインやアミノ酸等のスポーツサプリメントの摂取、さらに、タイムトライアル等の激しいトレーニングは控えるよう指示した。

C. 関節マーカーの測定

血清 MMP-3, 血清 TIMP-1 および血清 KS の測定は、各分子上の異なる部位を認識する2種類のモノクローナル抗体を用いた酵素免疫測定キット (パナクリア MMP-3・プレート¹³⁾, 富士薬品工業(株), hTIMP-1 測定用キット¹⁴⁾, 第一ファインケミカル(株), KS-ELISA キット¹⁵⁾, 生化学工業(株)にて行った。

D. 食事調査

試験期間中の食事は、できる限り普段の食生活を変えないよう指示した。また、試験飲料摂取前および摂取期間中 (15~17日目) において、各3日間の食事内容を自己記入方式により調査した。記入された食事内容から、市販ソフト (栄養相談室, OLYUMPUS 社製) を用いて栄養成分摂取量を解析した。

E. 統計処理

すべての測定データは、平均値±標準偏差で示した。また、測定データの有意差検定には、統計ソフト Stat View Ver 5.0 (SAS Institute Inc.) を用

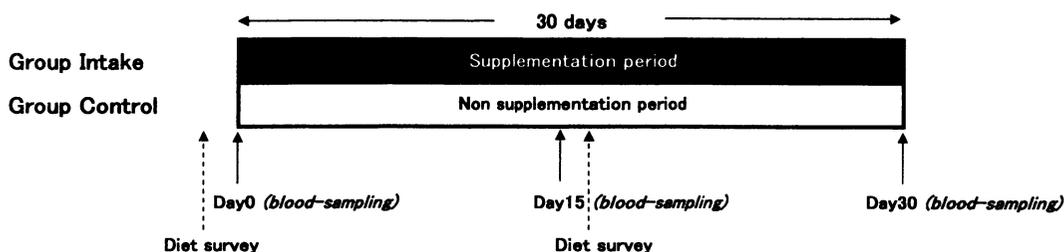


Fig. 1. Test schedule for test-drink supplementation, blood-sampling and diet survey. All subjects were randomly divided into two groups, Intake (n=7) and Control (n=6). The group Intake was supplemented with a test drink containing collagen and glucosamine hydrate for 30 days, while the group Control was not so.

Table 2. Physical characteristics of subjects.

Group	Age (years)	Height (cm)	Body mass (kg)	BMI ^{a)}	10km time (min)	MMP-3 ^{b)} (ng/ml)	TIMP-1 ^{c)} (ng/ml)	KS ^{d)} (ng/ml)
Intake (n=7)	21.9 ± 2.5	171.9 ± 8.4	60.4 ± 6.2	20.4 ± 1.1	37.8 ± 1.9	99.4 ± 27.0	159.6 ± 28.0	221.9 ± 73.5
Control (n=6)	23.5 ± 2.9	171.6 ± 6.1	60.6 ± 6.3	20.6 ± 1.4	37.4 ± 2.3	80.9 ± 21.7	147.9 ± 16.7	221.9 ± 58.2
probability	0.2922	0.9414	0.9382	0.8504	0.7582	0.2071	0.3909	0.9997

a) BMI : body mass index, b) MMP-3 : matrix metalloproteinase-3, c) TIMP-1 : tissue inhibitor of metalloproteinases-1, d) KS : ketaran sulfate
Values are means ± S.D.

い, 群間比較は Student's unpaired t-test により検定した。また, 群内の経日変化は, Repeated measure one-way ANOVA により検定し, F 値が有意であった場合には Fisher's PLSD 法を用いて多重比較を行った。これらの統計処理の有意性は危険率 5 %未満で判定した。

Ⅲ. 結 果

A. 関節マーカーの変化

血清 MMP-3 の変化を図 2 に示した。コントロール群は, 摂取前 (pre), 摂取15日目 (15日) および摂取30日目 (30日) において有意な変化は認められなかった。一方, 摂取群では15日および30日において pre と比較して有意に低値を示した。

血清 TIMP-1 の変化を図 3 に示した。摂取群, コントロール群いずれも実験期間を通じて変化は認められなかった。

血清 KS の変化を図 4 に示した。コントロール群は, 実験期間を通じて有意な変化は認められなかった。一方, 摂取群では15日および30日において pre と比較して有意に低値を示した。

B. 食事調査

被検者の食事内容をもとに, 摂取した栄養成分

を表 3 に示した。その結果, 試験期間および群間における差は認められなかった。

Ⅳ. 考 察

本研究の被検者は, 定期的に走運動を実施の男子大学生で, 試験期間中は通常のトレーニングメニュー (平均走行距離: 週 20 km) を実践していた。Roo たち⁴⁾ は, 走運動鍛錬者 (平均走行距離: 週 100~200 km) において, 健常者に比べ安静時の血清 KS が高値を示すことを報告している (走運動鍛錬者の平均値: 351 ng/ml, 健常者の平均値: 252 ng/ml)。しかし, KS を測定する場合, 標準品の精製度や由来により測定差が生じることから, 本結果 (摂取前での平均値: 222 ng/ml) と単純に比較することは困難である。我々と同様の測定キットを用いた報告¹⁶⁾ によれば, 健常者の平均血清 KS 値は 140 ng/ml であることから, 本被検者 (平均値: 222 ng/ml) は健常者に比べ高値であったといえる。これは, 走運動鍛錬者に至らない走運動愛好者においても, 一般の健常者と比べ血清 KS が高値を示すことを示唆するものである。しかし, ヒトにおける基準値が設定されていないため, どの程度高値であるのかまで考察することはできなかった。一方, 血清 MMP-3 の場

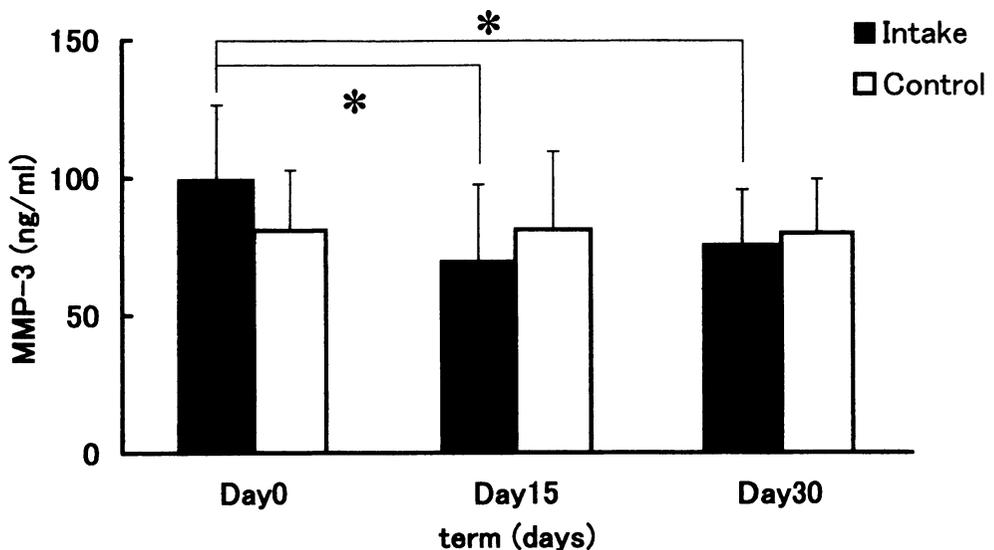


Fig. 2. Matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) in male subjects on Day 0, Day 15 and Day 30. Values are means \pm S. D. * $p < 0.05$

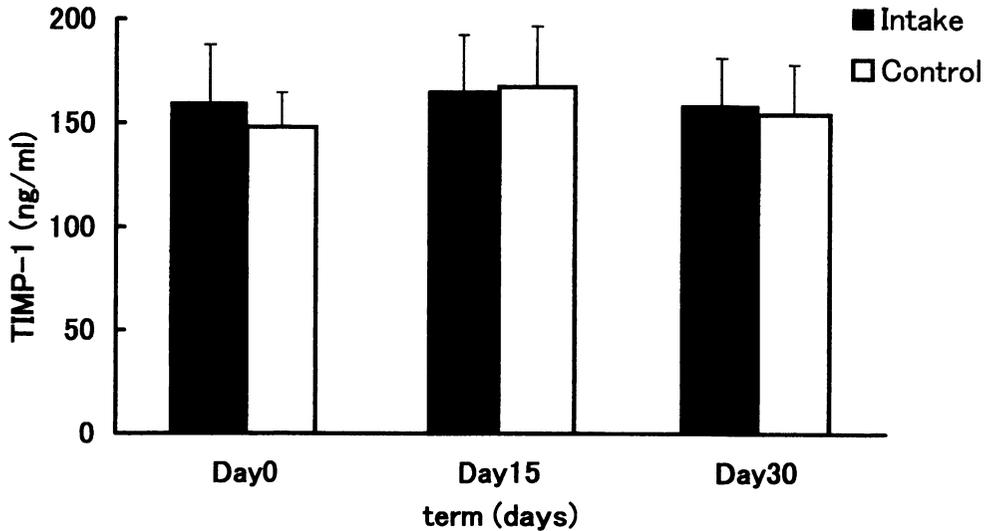


Fig. 3. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in male subjects on Day 0, Day 15 and Day 30. Values are means±S.D.

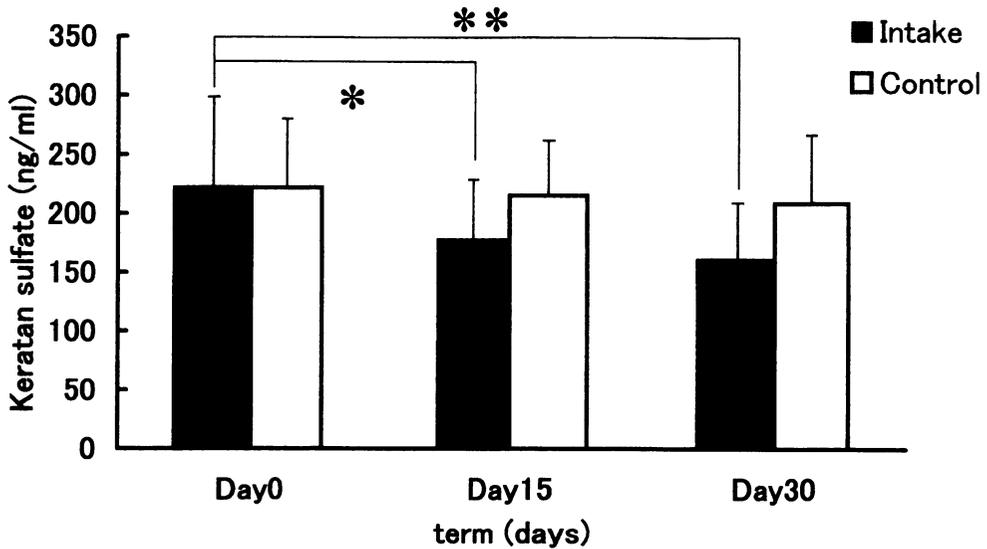


Fig. 4. Keratan sulfate in male subjects on Day 0, Day 15 and Day 30. Values are means±S.D. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

合、本被検者の平均値は 90.8ng/ml であり、基準値(20.2~121.0ng/ml)を満たしていた。血清 TIMP-1 は、血清 KS と同様に基準値が設定されていないが、我々と同じ測定キットを用いて関節リウマチ(rheumatoid arthritis: 以下 RA と記す)患者と健常者の比較を検討した報告¹⁷⁾(RA 患者

の平均値: 185 ng/ml, 健常者の平均値: 151 ng/ml)から、本被検者(平均値: 154 ng/ml)は健常者の平均値と変わらないことが確認された。これより、走運動愛好者の場合、関節マーカーのうち血清 KS が一般の健常者と比べ高値を示すことが示唆された。

Table 3. Daily nutrient intake during test period.

	pre-supplementation	supplementation period
Energy (kcal)		
Intake	1693±482	1742±546
Control	1725±523	1750±571
Protein (g)		
Intake	59.6±26.1	61.4±27.5
Control	60.4±28.6	62.1±28.1
Lipid (g)		
Intake	56.8±22.4	58.9±23.9
Control	57.4±24.7	59.5±25.1
Carbohydrate (g)		
Intake	234.4±62.3	241.2±65.1
Control	241.7±68.9	240.4±66.1
Salt (g)		
Intake	7.8±2.4	8.1±3.0
Control	7.9±3.4	8.1±3.7

Dietary intake was recorded on consecutive three days during each period, and a nutrient composition intake was analyzed on basis of them. Values are means±S. D.

本研究では、関節マーカーについてのみ血液分析を実施したため、一般的な健康状態に関わる項目について分析することができなかった。食事調査の結果から、性別・年齢・活動強度をもとに推奨される栄養所要量(活動強度をⅢとした場合、エネルギーは2,600kcal、タンパク質は65gに相当)と比較し各項目において低い傾向が認められた。しかし、試験期間中において体重減少や体調不良(下痢、倦怠感、めまいなど)を訴えるものはなかったことから、栄養摂取量による影響は少ないものと思われた。むしろ、本試験での食事調査は、連続する3日間に限られ、食事重量を厳密に測定するものではなかったことから、推奨所要量と実測値の間に差が生じたものと考えられた。今後、厳密な食事条件のもと検討を行い、食事栄養面と関節マーカーとの関わりを明らかにしてゆく必要があると思われた。

本研究の目的は、定期的に走運動を実施してい

る走運動愛好者を対象に、コラーゲン・グルコサミン混合液の継続摂取による関節マーカーの変化を明らかにし、関節部のコンディショニングに対する本飲料の有効性を検討することであった。

コラーゲンは、ヒトをはじめ動物を構成する線維状タンパク質で、コラーゲン摂取により関節炎の改善効果⁷⁾が認められている。一方、グルコサミンは、軟骨プロテオグリカンを構成するグリコサミノグリカンの主要成分で、コラーゲンとともに軟骨の柔軟性や弾力性に寄与している。*in vitro*の実験において、グルコサミンがコンドロイチンやヒアルロン酸の合成を促進すること¹⁸⁾、また*in vivo*の実験においては、家兔の軟骨損傷の修復効果⁸⁾およびヒトによる変形性関節症の治療効果^{10,11)}などが報告されている。また、Hashida たち¹²⁾は、コラーゲンとグルコサミンの併用摂取が、軟骨損傷の修復に効果的であることを確認している。

一方、関節マーカーのうち、MMP-3は至適pHを中性領域に持つタンパク質分解酵素であり、MMP-2やMMP-9をはじめとする他のMMPをも活性化すること¹⁹⁾から軟骨破壊の主要酵素と考えられている。また、TIMP-1はMMP-3の阻害酵素であり、軟骨細胞やマクロファージ等で産生される³⁾。さらに、KSは、グリコサミノグリカンの一種でその分布が関節軟骨に限定されることから、軟骨破壊を示す重要な関節マーカーである。

本試験から、コラーゲン・グルコサミン混合液の継続摂取により、血清KSはTomatsuたちの報告¹²⁾による健常者の平均値レベルまで有意な低下を示し、さらに血清MMP-3は基準値の範囲内において有意な低下を示した。これは、コラーゲンおよびグルコサミンの継続摂取が軟骨の損傷および炎症の抑制に働くことを裏づけるものと考えられる。また、食事調査より、コラーゲン・グルコサミン混合液の摂取前後において各栄養摂取量に差が認められなかったこと、コラーゲン・グルコサミン混合液の栄養成分(熱量:10kcal, タンパク質:0.2g)は栄養摂取量全体の1%にも満たないことから、本結果が食事栄養面の改善によるものではなくコラーゲンおよびグルコサミンの継続摂取によるものといえる。

近年、グルコサミンが一酸化窒素やプロスタグランジンE₂の合成を抑制すること²⁰⁾、好中球機能を抑制し抗炎症作用を発揮すること²¹⁾が*in vitro*の実験において報告されている。これらの知見は、これまで軟骨成分として栄養供給源に過ぎないとされていたグルコサミンが、炎症反応に伴う障害に対しても防衛的に作用し、活性酸素やMMPの生成を抑制することを示唆するものである。本研究は、グルコサミンおよびコラーゲン混合液の継続摂取により、軟骨の損傷および炎症の抑制を報告したはじめての研究であり、上述の報告を支持するものである。

また本研究の結果から、コラーゲンとグルコサミン混合物の摂取は、関節部への負担が高いと考えられる走運動愛好者において、軟骨破壊マーカーを減少させる効果があることが明らかになっ

た。運動による関節部の疾患は、競技種目や年齢、性別を問わず幅広く見られ、その対処法として外科的治療をはじめ固定、温熱、冷却による物理的治療、薬物の関節内投与に限られてきた。

しかしながら、本研究で示されたように、コラーゲンとグルコサミンの摂取が軟骨破壊を抑制する働きを持つのであれば、関節部への負担が高い運動実践者がこれらを利用することで関節部の炎症の予防や関節軟骨の保護、さらに関節のコンディショニングに役立てることができると期待される。今後、コラーゲンおよびグルコサミンの有効作用量の検討をはじめ、血液と関節液の各種関節マーカーの分析を通じて、コラーゲンとグルコサミンによる損傷の抑制、抗炎症メカニズムについての検討が必要であろう。

V. 要 約

本研究では、関節部への負担が高い走運動愛好者を対象として、コラーゲン・グルコサミン混合液の継続摂取が関節マーカーに及ぼす影響を検討した。その結果、30日間のコラーゲン・グルコサミン混合液摂取により、血清KSおよび血清MMP-3が摂取15、30日目において有意に低下することが認められた。本研究の結果は、コラーゲン・グルコサミン混合液の継続摂取が、関節軟骨の損傷および炎症を予防し、関節部のコンディショニングに対して有効であることを示唆するものである。

(受理日 平成16年8月31日)

文 献

- 1) Hasty, K. A., Reife, R. A., Kang, A. H., & Stuart, J. M. The role of stromelysin in the cartilage destruction that accompanies inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.*, (1990), **33**, 388-397.
- 2) Xie, D. L., Hui, F., Meyers, R., & Homandberg, G. A. Cartilage chondrolysis by fibronectin fragments is associated with release of several proteinases: stromelysin plays a major role in chondrolysis. *Arch. Biochem. Biophys.*, (1994), **311**, 205-212.
- 3) Okada, Y., Watanabe, S., Nakanishi, I., Kishi, J., Hayakawa, T., Watorek, W., Travis, J., & Nagase, H. Inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinases by neutrophil elastase and other serine proteinases.

- FEBS Lett.,(1988), **229**, 157-160.
- 4) 山根敏彦, 田中清介, 喜多 寛, 中野彰夫, 福田寛二, 久保田 恭, 丹 彰治, 松村文典, ジョギングによる血清ケラタン硫酸の変動, 日本整形外科スポーツ医学雑誌, (1991), **10**, 487-489.
 - 5) Roos, B. H., Dahlberg, L., Hoerrner, L. A., Lark, M. W., Thonar, E. J. A., Shinmei, M., Lindqvist, U., & Lohmander, L. S. Markers of cartilage matrix metabolism in human joint fluid and serum : the effect of exercise. *Osteoarthritis Cart.*,(1995), **3**, 7-14.
 - 6) 長谷川隆則, 岩井浩二, 田口靖希, 森松文毅, 山田良司, 中村孝志, 佐藤健司, 大槻耕三, 経口摂取したニワトリ I 型, II 型コラーゲンペプチドの血中吸収, 食肉の科学, (2003), **44**, 139-142.
 - 7) Bagchi, D., Misner, B., Bagchi, M., Kothari, S. C., Downs, B. W., Fafard, R. D., & Preuss, H. G. Effects of orally administered type II collagen against arthritic inflammatory diseases : a mechanistic exploration. *Int. J. Clin. Pharmacol. Res.*,(2002), **22**, 101-110.
 - 8) Tamai, Y., Miyatake, K., Okamoto, Y., Takamori, Y., Sakamoto, H., & Minami, S. Enhanced healing of cartilaginous injuries by glucosamine hydrochloride. *Carbohydr. Polym.*(2001), **48**, 369-378.
 - 9) 梶本修身, 坂本廣司, 高森吉守, 梶谷典正, 今西利之, 松尾龍之介, 梶谷祐三, 変形性関節症に対するグルコサミン塩酸塩の治療効果, 日本臨床栄養学会雑誌, (1998), **20**, 41-47.
 - 10) Noack, W., Fisher, M., Forester, K. K., Rovati, L. C., & Setnikar, I. Glucosamine sulfate in osteoarthritis of the knee. *Osteoarthritis Cart.*,(1994), **2**, 51-59.
 - 11) Reginster, J. Y., Deroisy, R., Rovati, L. C., Lee, R. L., Lejeune, E., Bruyere, O., Giacovelli, G., Henrotin, Y., Dacre, J. E., & Gossett, C. Long-term effects of glucosamine sulfate on osteoarthritis progression : a randomized, placebo-controlled clinical trial. *Lancet*, (2001), **357**, 251-256.
 - 12) Hashida, M., Miyatake, K., Okamoto, Y., Fujita, K., Matsumoto, T., Morimatsu, F., Sakamoto, K., & Minami, S. Synergistic effects of D-glucosamine and collagen peptides on healing experimental cartilage injury. *Macromol. Biosci.*,(2003), **3**, 596-603.
 - 13) Obata, K., Iwata, K., Okada, Y., Kohrin, Y., Ohuchi, E. Yoshida, S., Shinmei, M., & Hayakawa, T. A one-step sandwich enzyme immunoassay for human matrix metalloproteinase 3 (stromelysin-1) using monoclonal antibodies. *Clin. Chem. Acta.*,(1992), **211**, 59-72.
 - 14) Kodama, S., Iwata, K., Iwata, H., Yamashita, K., & Hayakawa, T. Rapid one-step sandwich enzyme immunoassay for tissue inhibitor of metalloproteinases. *J. Immuno. Met.*,(1990), **127**, 103-108.
 - 15) Thonar, E. J. A., Lenz, M. E., Klintworth, G. K., Caterson, B., Peckman, P., Glickman, P., Katz, R., Huff, J., & Kuettner, K. Quantification of keratin sulfate in blood as a marker of cartilage catabolism. *Arthritis Rheum.*,(1985), **28**, 1367-1376.
 - 16) Tomatsu, S., Okamura, K., Taketani, T., Orii, K. O., Nishioka, T., Gutierrez, M. A., Velez, C. S., Fachel, A. A., Grubb, J. H., Cooper, A., Thornley, M., Wraith, E., Barrera, L. A., Giugliani, R., Schwartz, I. V., Frenking, G. S., Beck, M., Kircher, S. G., Paschke, E., Yamaguchi, S., Ullrich, K., Isogai, K., Suzuki, Y., Orii, T., Kondo, N., Creer, M., & Noguchi, A. Development and testing of new screening method for keratan sulfate in mucopolysaccharidosis IVA. *Ped. Res.*,(2004), **55**, 592-597.
 - 17) Yoshihara, Y., Obata, K., Fujimoto, N., Yamashita, K., Hayakawa, K., & Shimmei, M. Increased levels of stromelysin-1 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in sera from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis. Rheum.*,(1995), **38**, 969-975.
 - 18) Towheed, T. E., & Anastassiades, T. P. Glucosamine therapy for osteoarthritis. *J. Rheumatol.*,(1999), **26**, 2294-2297.
 - 19) Ito, A., & Nagase, H. Evidence that human rheumatoid synovial matrix metalloproteinase 3 is an endogenous activator of procollagenase. *Arch. Biochem. Biophys.*,(1988), **267**, 211-216.
 - 20) Meininger, C. J., Kelly, K. A., Li, H., Haynes, T. E., & Wu, G. Glucosamine inhibits inducible nitric oxide synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*,(2000), **279**, 234-239.
 - 21) 長岡 功, 華 見, 勝呂 栞, 坂本廣司, グルコサミンの好中球機能抑制作用とそのメカニズム, 炎症・再生, (2002), **22**, 461-468.