

# 骨, 関節軟骨の老化とコラーゲン

Biochemical changes in human bone and articular cartilage collagens with age

藤井克之 梶原敏英 室田景久\*

## はじめに

ヒトが高齢になるにつれ, 皮膚, 血管の伸展や弾力性の低下, 骨の粗鬆化, 関節軟骨の変性など, 全身の結合組織に種々の生理的变化が生じてくる。こうした老化現象の発現には, 著明な弾性を有する線維性蛋白質であるコラーゲンの物理, 化学的諸性質の変化が密接な関連性を有していることが知られている。すなわち, コラーゲンは結合組織の主要な構成成分として全身に広く分布し, 生体を構成する全蛋白質のおよそ1/3にも達していることから, 生体における生理あるいは病態発生面で多くの役割を演じている。コラーゲンの主たる生理機能は各種結合組織に機械的支持作用を与えることであるが, そのほか, 全身の水, 電解質, ホルモンなどの伝達, 保持, 緩衝などに関与し, さらに骨および軟骨コラーゲンは無機結晶の核形成と成長を促す作用を有することが報告されている。これまでの老化とコラーゲンに関する研究からは, 動物の老化に伴い, コラーゲン線維はしだいにその太さを増し, 熱, 酵素および種々の変性剤(溶剤)処理に対する抵抗性を高めてゆくことが明らかにされている<sup>2,28,29,30</sup>。しかしながら, こうした研究はすべて寿命の短い実験動物のコラーゲンについてなされており, その検索内容もコラーゲンの分子レベルでの変化を探るまでには至っていない。

近年, 生体における各種結合組織の生理, 病態を解明しようとする積極的な試みがなされるにつれ, コラーゲン化学に関する高度の研究が不可欠なものとして注目され, この面での研究が急速な進歩をとげてきた。その結果, コラーゲンのペプチド鎖間には架橋結合構造(cross-link)が存在し, これがコラーゲンの生理機能の発現, ならびに老化に伴うコラーゲンの物理, 化学的諸性質の

**Key words:** bone, articular cartilage, collagen, aging

\* K. Fujii (講師), T. Kajiwara, K. Murota (教授): 東京慈恵会医科大学整形外科 (Dept. of Orthop. Surg., The Jikei University School of Medicine, Tokyo).

変換に重要な役割を演じていることが明らかにされている<sup>42</sup>。筆者らは過去数年にわたり, ヒトの結合組織, 特に骨, 関節軟骨といった硬組織コラーゲンについて, その胎生から高齢に至るまでの生化学的变化について詳細な分析を行ってきた<sup>10~13,15,19,21,22</sup>。こうした研究は, 今後, 加齢を基盤として発生する骨あるいは関節の種々の病態を明らかにし, その予防と治療を考えてゆくうえにおいて重要な情報を与えてくれるものと考えられる。

本論文の目的はこれまでの筆者らの一連の研究結果を要約して紹介するとともに, 従来からの老化とコラーゲンに関する概念との間の相異点について論述せんとするところにある。なお, 結合組織におけるコラーゲンの生合成, 線維形成, ならびに異分解などに関する基礎的知識についてはすでに本誌にまとめた<sup>20</sup>ので省略する。

## コラーゲンの生化学的变化

胎生4ヵ月から89才に至る新鮮死体から, 大腿骨骨皮質および膝関節軟骨(胎児では, 骨端発育線部分を除いた大腿骨顆部の軟骨組織)を採取し, 研究材料とした。

### 1. コラーゲン含有量

各年代における骨および関節軟骨に含まれるコラーゲ

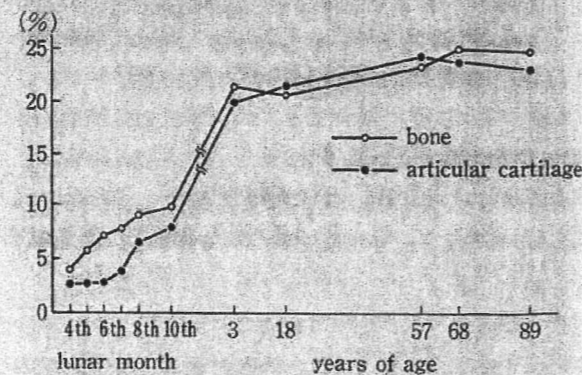


図1. コラーゲン量の経年的変化。コラーゲン量は組織の湿性重量に対する割合(%)として示される。

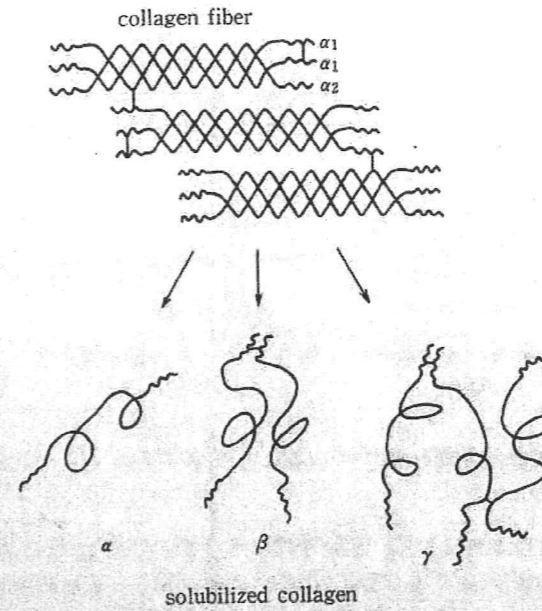


図2. コラーゲンの可溶化様式。

ン量を測定し, その経年的変化を示したものが図1である。胎生4ヵ月での骨のコラーゲン含有量は組織湿性重量の約4%であり, 同時期での軟骨のコラーゲン含有量は2.4%となっている。これらの値は胎令がすすむにつれて著明に増加し, 胎生10ヵ月では骨のコラーゲン含有量は湿性重量の約9%, 軟骨のそれは約7%にまで達している。さらに生後3才になると骨のコラーゲン含有量は湿性重量の約25%, 関節軟骨のそれは約20%にまで増加している。その後89才に至るまでこれらの値はほとんど変化が認められず, 各組織におけるコラーゲン合成量の著しい変化は胎生期を通じてのみ生じていることがわかる。

このことから, これら組織は胎令の進行に伴い, しだいにコラーゲン生合成を高め, それぞれが生理的機能の異なった結合組織へと急速に発達してゆくことがうかがえる。しかしながら, 胎生期が終り, ひとたび骨, 関節軟骨組織の形成が完了すると, コラーゲンの合成量そのものには変化はみられず, むしろ合成されたコラーゲンの分子レベルでの変化が優位に立つものと思われる。

動物が老化すると, 皮膚, 腱, 靭帯といった軟部組織はしだいにその弾性を失い, 硬化する傾向を呈してくる。こうした現象は, これまでコラーゲン合成細胞における転写, 翻訳機構がすすみ, 細胞間基質へのコラーゲン線維の蓄積が生ずるために発生するものと一般に考えられてきた<sup>30</sup>。しかしながら, 筆者らが寿命の長いヒトの皮膚, 腱, 骨, 関節軟骨などにおけるコラーゲン含有量の経年的変化について検索した結果では, 何ら著しい

変化を見出すことができなかったのである。こうしたことから, 後述のごとく, ヒトの各種結合組織にみられる老化現象の発現には, コラーゲンの合成量の変化よりもむしろ, 合成されたコラーゲン分子の化学構造面での変化がより重要な因子として働いていることがうかがえるのである。

## 2. コラーゲンの化学的安定性

結合組織の細胞間基質において形成されたコラーゲン線維は, 中性塩, 酸あるいはアルカリ処理を受けるとその一部が溶解することが証明されている<sup>25,38</sup>。

近年, こうしたコラーゲンの溶解性(可溶性)の決定には, コラーゲンの有する特異な化学構造, 特に架橋結合構造が重要な因子として働いていることが明らかにされている<sup>1,3,41</sup>。すなわち, 中性塩抽出により可溶化されるコラーゲン(中性塩可溶性コラーゲン)には架橋結合が少なく, これに分子内架橋結合が導入されて $\beta$ ,  $\gamma$ 鎖が多くなるにつれ, 酸抽出で初めて可溶化されるようになり(酸可溶性コラーゲン), さらに分子間架橋が導入されると, いわゆる不溶性コラーゲンになっていくことが現在一般に認められている。図2は, コラーゲン線維に上記のごとく化学抽出を加えたさいに, 溶媒に分散されるコラーゲン分子のペプチド鎖の状態を示したものであるが, 主として三つの種類に分類することができる。すなわち, 1) コラーゲン分子を構成する3本のポリペプチド鎖( $\alpha$ 鎖)のうち1本が単独に遊離するもの, 2) ポリペプチド鎖の2本が, 共有性の架橋結合を介してdimer( $\beta$  component)として遊離するもの, さらに, 3) ポリペプチド鎖3本が架橋結合を介して trimer( $\gamma$  component)として遊離するもの, などである。

これまで, コラーゲンの不溶性と動物の老化との間には相関関係があるとされ, 幼若動物には可溶性コラーゲン量が多く, 老化してゆくにつれ, しだいに不溶性コラーゲンに変化してゆくと考えられてきた。

図3, 4は, 骨, 関節軟骨をEDTA溶液にてあらかじめ脱灰し, 1.0 M食塩, 次いで0.5 M酢酸溶液にて抽出したさいに可溶化されるコラーゲン量を測定し, 経年的に比較検討したものである。胎生4ヵ月での骨の可溶性コラーゲン量は, 全コラーゲン量の13%強にも達するが(図3), 生後3才になると1.9%と減じ, 18才ではほとんどすべてのコラーゲンが不溶化を呈するようになっていく。比較的多くのコラーゲンが可溶化される胎生期での中性塩および酸可溶性コラーゲン量の変化をみても(図3), 酸抽出に比べ, 中性塩抽出により

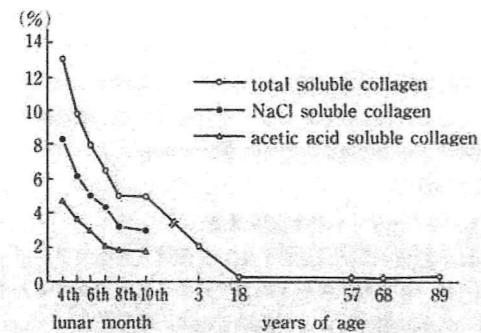


図 3. 骨の可溶性コラーゲン量の経年的変化。

絶えず多くのコラーゲンが可溶化されていることがわかる。

一方、関節軟骨の可溶性コラーゲン量は(図4)、胎生4ヵ月で全コラーゲン量の6.0%であり、胎生5ヵ月ではすでに2.0%弱となっている。この値は胎生の進行とともにさらに減少し、骨コラーゲンと同様に、18才ではきわめて少量のコラーゲンが可溶化されるにすぎなくなっている。胎生期における可溶性コラーゲンをみると(図4)、そのほとんどが中性塩抽出によって可溶化されており、酸抽出ではごくわずかな量のコラーゲンが溶出されるにすぎないことがわかる。

胎生期より高令に至るまでの全経過を通じ、関節軟骨の可溶性コラーゲン量は、骨のそれと比べて明らかな低値を示しているが、細胞間質における糖とコラーゲン分子との結合量の相異が、こうした中性塩あるいは酸抽出による溶解性の相違を生みだしているものとする。

### 3. 架橋結合構造

コラーゲン分子を構成する3本のポリペプチド鎖( $\alpha_1$ ,  $\alpha_1$  および  $\alpha_2$  鎖)の間には多数の水素結合やイオン結合のような非共有結合があり、分子の安定をはかっているが、これらは熱あるいは化学処理により容易に切断されることが古くから知られてきた。1966年に至ると、こうした結合とは別に、コラーゲンの分子内に共有性の強い架橋結合が存在する可能性のあることが示唆され、おそらくはリジン由来のアルデヒド(アリジン)の二つが互いに結合した構造(アルドール縮合)を有するものであらうとされた<sup>2)</sup>。しかしながら、コラーゲン線維の有する強い安定性は、この分子内の架橋結合の存在のみからでは説明されず、この点を解明しようとする研究があいまいでなされるようになった。その結果、コラーゲンの分子間にもシッフ塩基型の架橋結合が存在することが見出され、これが各組織におけるコラーゲンの安定した線維形成、あるいは機械的支持性の発現にもつ

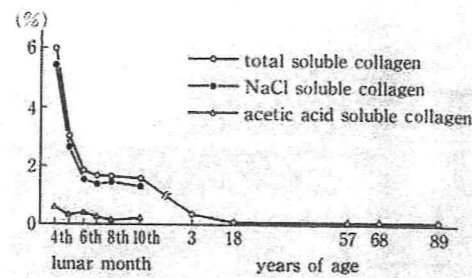


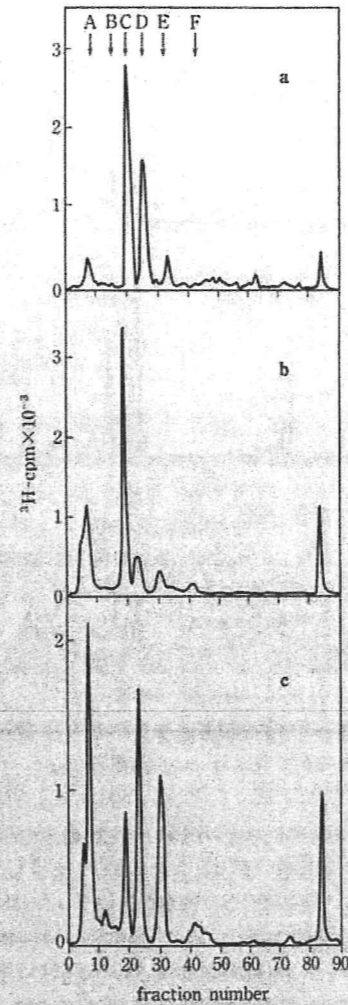
図 4. 関節軟骨の可溶性コラーゲン量の経年的変化。

も重要な役割を演じていることが明らかにされたのである<sup>1,4)</sup>。

このようにして、現在ではコラーゲンの分子内および分子間には、リジン、ヒドロキシリジン由来のアルドール縮合型、ならびにシッフ塩基型の架橋結合が存在し<sup>1,4)</sup>、これらの形成過程にはリジノキシダーゼが不可欠な酵素として働いていることが明らかにされている<sup>35,36)</sup>。こうしたリジン、ヒドロキシリジン由来の架橋結合は、 $\text{NaBH}_4$ (ホウ化水素ナトリウム)により還元を行えば安定化と同時に<sup>3</sup>Hラベルすることができ、放射能を指標とすることにより、これまでに9種類の異なる構造を有する架橋結合が分離、同定されている(詳細については文献42)を参照されたい)。

近年、 $\text{NaBH}_4$ による還元、加水分解、クロマトグラフィーによる分離といった架橋結合の直接的な分析方法が確立されると、興味ある研究課題の一つとして、各種結合組織におけるコラーゲンの架橋結合の比較分析が盛んにとりあげられるに至っている。このことは、動物の種差、あるいは同一動物でも組織によってコラーゲンの溶解性、その他の物理、化学的諸性質が異なり、これらの相異を生む因子として架橋結合が注目され始めていたからである。こうした面での研究から、コラーゲンに形成される架橋結合構造には組織特異性があることが明らかにされ、骨、軟骨あるいは象牙質といった硬組織コラーゲンには、dihydroxylysinoxorleucine (diOH-LNL) が主たる還元性架橋結合として存在することが見出されている。一方、皮膚、腱といった軟組織コラーゲンには hydroxylysinoxorleucine (OH-LNL) がもっとも多く存在することが知られている(図5)。

上記のごとく、コラーゲン線維に強い機械的支持性をもたらす架橋結合は、同時に動物の老化に伴うコラーゲン線維の安定化に重要な因子として働いているものとして注目され、その結果、加齢に伴う各種結合組織にお



A: unknown (fall through), B:  $\text{N}^6$ -Hexosylhydroxylysine, C: dihydroxylysinoxorleucine, D: hydroxylysinoxorleucine, E: lysinoxorleucine, F: histidino-hydroxymerodesmosine

a. 骨コラーゲン, b. 関節軟骨コラーゲン, c. 皮膚コラーゲン。

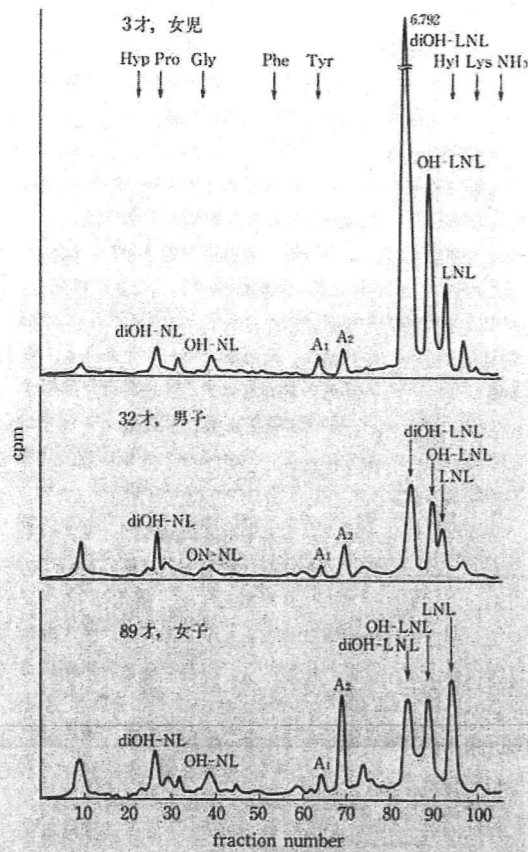
図 5. Aminex A-5 カラム (0.9×18 cm) による架橋結合分析パターン。

るコラーゲン線維の物理、化学的安定性の増加は、コラーゲンの分子間に形成される架橋結合の形成量が増加するためにもたらされる現象として一般に考えられてきた。しかしながら、こうした概念が広く抱かれていた7,8年前には、コラーゲンの架橋結合に関する研究はきわめて浅く、この点を証明する正確な実験的根拠は何

ら示されていなかった。当時、コラーゲンの架橋結合構造に関する研究は、主として皮膚、腱といった軟組織コラーゲンについてなされており、研究手技上より複雑さの伴う骨、軟骨、象牙質といった硬組織コラーゲンについての分析はほとんどなされていなかった。さらに、ヒトの結合組織コラーゲンの架橋結合を分離同定し、その結合状態について検討した報告も皆無な状態であった。そこで筆者らは、ヒトの骨、関節軟骨を EDTA 脱灰することにより、コラーゲンを変性させることなく精製し、これらの架橋結合を直接的に分析する方法についての検討を行なった。その結果、硬組織コラーゲンからも、軟組織コラーゲンと同様の構造を有する架橋結合を分離することに成功し、これらの形成状態が軟組織コラーゲンのものと著しく異なるという興味ある事実を見出したのである(図5)。

それではいったい、このような架橋結合が、ヒトの老化に伴うコラーゲンの不溶化(安定化)過程において、どのように変化してゆくのであろうか。図6,7は、この点に関する検索結果を示したものであるが、骨、関節軟骨コラーゲンの双方において、主要な還元性架橋結合である dihydroxylysinoxorleucine (diOH-LNL) が加齢とともに著明に減少していることがわかる。また同時に、軟組織コラーゲンにおいて主要な還元性架橋結合として認められる hydroxylysinoxorleucine (OH-LNL)、さらには lysinoxorleucine (LNL) の占める割合も減少する傾向が認められた。

さて、従来一般に、動物の加齢に伴うコラーゲンの不溶化は、架橋結合の形成量が増加するためにもたらされると考えられてきたわけであるが、こうした通念に矛盾した筆者らの分析結果をどのように説明したらよいのであろうか。この疑問を解くために、筆者らは下記のごとく三つおりの概念を前提とし、これらの可能性の有無についてさらに検討を加えた。すなわち、第一の考え方は、老化に伴い、生体内ですでにシッフ塩基部分の還元がすすみ、より安定な結合になっており、 $\text{NaBH}_4$ にて還元されるものが減少しているということである。第二には、シッフ塩基型結合が中間体として働き、これらが次のプロセスを経て、もはや  $\text{NaBH}_4$  では還元されない未知のより複雑な架橋へと変換しているということ。第三には、組織内コラーゲンは常に代謝回転を営んでいるため、シッフ塩基型架橋結合を含むコラーゲンがすでに異化されてゆくと同時に、現在的手段では検出することのできない架橋結合が、コラーゲンの安定性の主役を担うようになるという考え方である。いずれの考え方



diOH-NL: dihydroxynorleucine, OH-NL: hydroxynorleucine, A<sub>1</sub>+A<sub>2</sub>: hexosylhydroxylysine, diOH-LNL: dihydroxylysinonorleucine, OH-LNL: hydroxylysinonorleucine, LNL: lysinonorleucine

図 6. Aminex A-4 カラム (0.9×45 cm) による骨コラーゲンの架橋結合分析パターン。

も、シッフ塩基型の還元性架橋結合が、プロセスは異なるにせよ、非還元性の、より安定した架橋結合へと変換してゆくのではなからうかという推論に基づくものであり、このような推論は、後述のごとく、コラーゲンに含まれる全還元性物質の経年的変化に関する筆者らの分析結果から、現在ではほぼ間違いのない事実として支持されているに至っている。しかし、実際には、還元性架橋結合の置きかわりとしてあらたに形成された非還元性の架橋結合を分離することは、現段階ではきわめて困難なことである。これまでに、ハイドロキシアルドールヒスチジン<sup>28)</sup>、ビリジノリン<sup>29)</sup>といったものが非還元性の架橋結合として分離、報告されているが、これらの中にはいまだ疑問が残され、特にビリジノリンについ

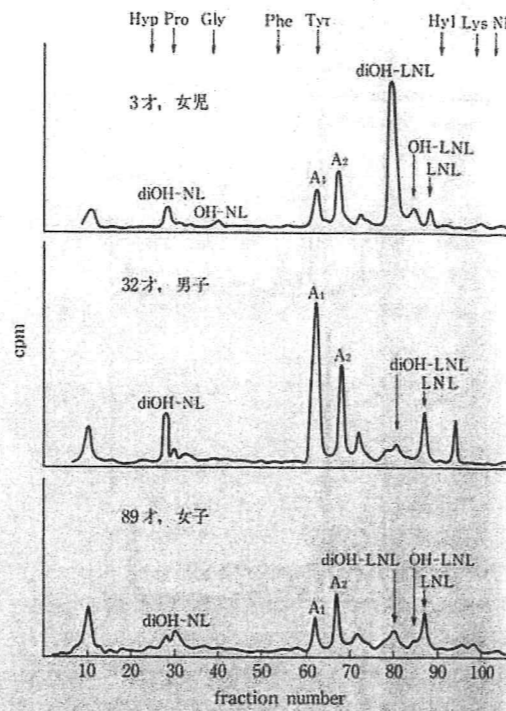


図 7. 図 6 と同様の関節軟骨コラーゲンの架橋結合分析パターン。

ては検出過程で生じた artifact である可能性が強いとの指摘もなされている<sup>9)</sup>。

以上、ヒトの生後の骨、関節軟骨コラーゲンにおける架橋結合の経年的変化について述べたが、胎生期でのこれらのコラーゲンの架橋結合はいかに変化するのであろうか。この点に関する検索を行なった結果、骨、関節軟骨コラーゲンは、胎令の進行につれ、著明に不溶化していくにもかかわらず、それら架橋結合の形成状態には何ら著しい変化は認められなかった。したがって、強い機械的支持作用の発現を必要としない胎生期におけるコラーゲンの成熟機構には、コラーゲンの架橋結合よりもむしろ、コラーゲン分子と周囲基質との結合状態の変化がより深く関与しているものと思われる。このことは、後述のごとく、胎令の進行に伴い、コラーゲン分子と糖との結合量が著しく変化するという事実により強く裏付けされるものである。

4. 還元性物質

コラーゲン線維に含まれるシッフ塩基型、およびアルドール縮合型の還元性架橋結合量、ならびに架橋結合前駆体であるアルデヒド形成量を知る方法として、筆者ら

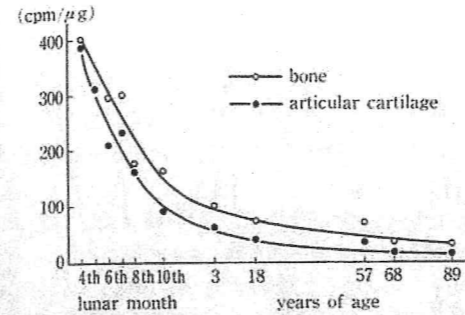


図 8. 骨および関節軟骨コラーゲンの還元性物質量の経年的変化。

はコラーゲンを NaB<sup>3</sup>H<sub>4</sub> にて還元した後、ラベルされた <sup>3</sup>H の radioactivity を単位 hydroxyproline 量当りで求めるといった手段をとってきている<sup>11,14,16-18,20)</sup>。この方法により、骨および関節軟骨コラーゲンの還元性物質量を測定し、その経年的変化について示したものが図 8 である。骨コラーゲンの specific radioactivity は、胎生より高令に至るまでの全経過を通じて関節軟骨コラーゲンのそれより高値を示しているが、双方とも加齢に伴い漸次著明に減少してゆく傾向を示している。この事実は、加齢とともに還元性の架橋結合の占める割合が減少してゆくという架橋結合の分析結果ときわめてよく一致しており、コラーゲンの成熟は、リジン、ハイドロキシリジン由来の還元性架橋結合の形成量が増加するためにもたらされるのであるとする従来の概念を強く否定するものである。このように、加齢に伴いコラーゲンの還元性架橋結合の占める割合が減少し、同時に還元性物質も減少してゆくという事実は、硬組織コラーゲンのみならず、腱あるいは皮膚などの軟組織コラーゲンにおいても見出されている<sup>11,20)</sup>。このことから、現在では、各組織の老化の発現につながるコラーゲン線維の安定性の増加は、従来から論じられてきたようなコラーゲンの分子間架橋結合の量的変化によるよりは、むしろ架橋結合の質的变化によってもたらされるものと考えられるに至っている<sup>12)</sup>。すなわち、リジン、ハイドロキシリジン由来のアルデヒドから形成される還元性架橋結合は、コラーゲン線維の安定化機構においては単に中間体として働いているにすぎず、これがさらに安定した非還元性の架橋構造へと転換していくものと考えられている。

5. 糖付加量

コラーゲンは、その生合成過程において、グルコースあるいはガラクトースといった糖の転移反応を受けることが明らかにされている。すなわち、コラーゲンのペプ

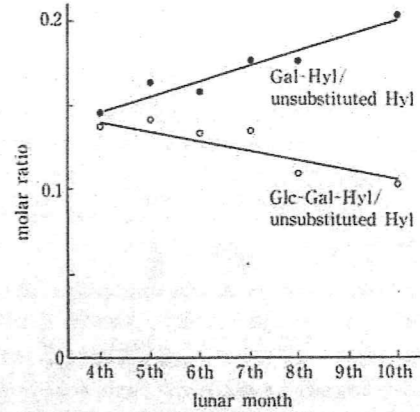


図 9. 胎生期の骨コラーゲンのハイドロキシリジンと糖との結合様式とその量的変化。

チド鎖中に含まれるハイドロキシリジンのうちいくつかのものは、ガラクトシールトランスフェラーゼ、あるいはグルコシールトランスフェラーゼの働きを受け、その水酸基部分にガラクトースがグリコシド結合し、さらにグルコースが付加される<sup>5,10)</sup>。これまで、こうしたハイドロキシリジンと糖との結合様式には、1) ガラクトースのみが結合したもの、2) 結合したガラクトースにさらにグルコースが結合しているもの、との二つおりのものがあることが知られている。このようなコラーゲンと糖との結合の意義については、コラーゲンの細胞外への分泌のさいの膜透過<sup>9)</sup>、あるいはコラーゲンの線維形成の制御機構<sup>34)</sup>などと関連があるのではないかと指摘がなされている。また一方では、転移した糖は、細胞間基質を構成する非コラーゲン性の蛋白質と結合する結果、結合組織内においてコラーゲン線維に高い安定性をもたらすものとして注目されている。

ヒトの胎生から高令に至るまでの間には、図 9 に示すごとく、胎生期の骨コラーゲンにおいてこうした糖との結合状態に著しい変化が認められている。すなわち、胎令がすすむにつれ、ガラクトースのみと結合したハイドロキシリジン量は、ガラクトース、およびグルコースの二糖と結合したハイドロキシリジン量よりも増加してゆき、こうした変化が胎生期における骨コラーゲンの安定性の増加に重要な役割を果たしているものと推測される。

6. コラーゲンの分子構成

コラーゲン分子は 3 本のポリペプチド鎖 (α 鎖) がより合って構成されるが、このポリペプチド鎖の相違により、これまでに主として 4 種類のコラーゲン分子が生

体内結合組織から分離され、しかも組織特異性のあることが認められている<sup>8,9,27,31-33</sup>。すなわち、骨、皮膚、腱、線維軟骨などには $[\alpha_1(\text{I})]_2\alpha_2$ として表される type I コラーゲン、硝子様、ならびに弾性軟骨には $[\alpha_1(\text{II})]_3$ として表される type II コラーゲン、幼若皮膚、筋肉組織には $[\alpha_1(\text{III})]_3$ として表される type III コラーゲン、基底膜には $[\alpha_1(\text{IV})]_3$ として表される type IV コラーゲンが存在していることが知られている。

このように、これまで正常な腱、軟骨組織は、動物の一生を通じて絶えず type I、あるいは type II コラーゲンといった単一のコラーゲン分子を合成するにすぎないといった一般的概念が抱かれてきたのであるが、筆者らは、長い寿命を有するヒトのこれら組織においては、胎生から高令に至る間に絶えず同一のコラーゲン分子のみが合成されていくものとは考えがたく、アミノ酸組成、配列の多少異なったいくつかのコラーゲンペプチド鎖が合成されている時期もありうるのではないかと考えた。このような可能性は、幼若動物の皮膚においては、type III コラーゲンと type I コラーゲンとが同時に合成されているという事実<sup>7</sup>から考えてもかなり信頼性の高いものと思われる。この点に関する検索を行なう目的で、まず胎生から高令に至るまでの骨、関節軟骨からペプシン可溶性コラーゲンを調製し、SDS ポリアクリルアミド電気泳動を行なった。

その結果、胎生より10才前半までの骨コラーゲンにおいては、 $\alpha_1(\text{I})$ 鎖と $\alpha_2$ 鎖との占める割合が2:1としては観察されなかった。この事実から、この時期での骨組織は、単に2本の $\alpha_1(\text{I})$ 鎖と1本の $\alpha_2$ 鎖とから構成される type I コラーゲンのみを合成するとどまらず、他の何らかの未同定のコラーゲン分子をも同時に合成している可能性のあることが強く示唆された。すなわち、10才前後の骨コラーゲンでは、 $\alpha_1(\text{I})$ 鎖と $\alpha_2$ 鎖の占める割合が4~5:1となっており、 $\alpha_1(\text{I})$ 鎖の泳動されてくるポリアクリルアミドゲル部分には、 $\alpha_1(\text{I})$ 鎖ときわめて類似したコラーゲンペプチド鎖が存在することが推測された<sup>10</sup>。こうした幼若な骨組織でのコラーゲンの分子構成の変化は、Uitto<sup>10</sup>によっても報告され、 $\alpha_1(\text{I})$ 鎖が3本集合した $[\alpha_1(\text{I})]_3$ という型のコラーゲン分子が存在していることが明らかにされている。

それでは、胎生期における骨コラーゲンはどのような分子構成を有しているのだろうか。この点を明らかにするため、胎生期における骨組織から多量に分離、精製することのできる中性塩および酸可溶性コラーゲンを用いて、詳細な分析を行なった。図10aは、中性塩抽出

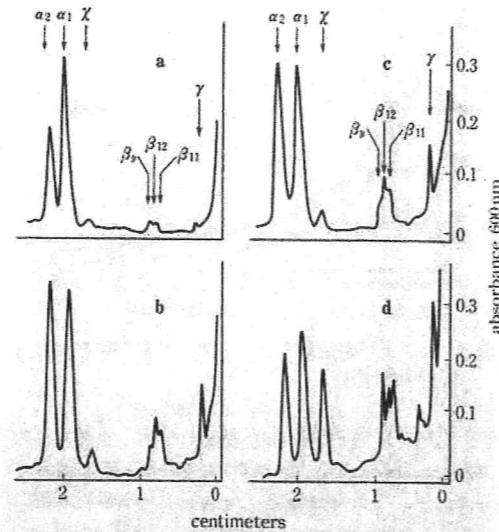


図10. 胎生期の骨コラーゲンの分子構成。

により可溶性したコラーゲンについて、SDS ポリアクリルアミド電気泳動を行なったあとのデントメトリックパターンであるが、 $\alpha_1$ 鎖よりもやや遅れた位置に、成人骨コラーゲンではみられない未同定のポリペプチド鎖(X鎖と命名)が少量泳動されてくることが観察された。この中性塩可溶性コラーゲンをペプシン処理し、コラーゲン分子の末端部分を切断することにより、コラーゲンペプチド鎖のポリマーをほくした形で電気泳動を行なったものが図10bである。X鎖の占める割合は増加しており、 $\alpha_1$ と $\alpha_2$ 鎖の占める割合がほぼ等しくなる現象が観察された。また、酸抽出により可溶性したコラーゲンについてみると(図10c)、ポリペプチド鎖の泳動パターンは、中性塩可溶性コラーゲんにペプシン処理を加えたものにきわめて類似したものであった。さらに、この酸可溶性コラーゲんにペプシン処理をほくして電気泳動を行なった結果、X鎖の占める割合が著しく増加する傾向が認められた(図10d)。

それでは、このように $\alpha_1$ 鎖よりもやや遅れて泳動されてくるX鎖とはいかなるペプチドなのであろうか。コラーゲンのように螺旋構造をもたない非コラーゲン性の蛋白質であれば、ひとたびペプシン処理を受けると、そのペプチド鎖の結合は容易に分解され、電気泳動後のポリアクリルアミドゲル上からはもはやその姿は観察されなくなってしまうはずである。このことから、このX鎖はペプシン処理を加えても分解されることのないコラーゲン性の蛋白質であることは明らかである。しかしなが

ら、このX鎖がそのアミノ酸組成においていかなる特徴を有するものか、あるいはどのような型のコラーゲン分子の構成に関与するものであるかについては、分析に用いる十分な量の資料を分離、精製することがきわめて困難なことから、未解決の問題として残さざるをえなかった。

ところが近年、Rhodesら<sup>37</sup>の幼若骨および軟骨コラーゲンに関する研究から、筆者らの見出したX鎖部分には $\alpha A$ 、 $\alpha B$ と命名される二つの異なるコラーゲンポリペプチド鎖が存在することが見出され、おそらくは未分化間葉系細胞あるいは線維芽細胞由来のものであろうとされている。しかしながら、こうした $\alpha A$ 、 $\alpha B$ コラーゲンペプチド鎖が、実際にどのようなかたちでコラーゲンの分子形成に関与するものかについては明らかにされておらず、 $[\alpha A]_3$ 、 $[\alpha B]_3$ あるいは $\alpha A(\alpha B)_2$ といった構成を有する可能性が強いとされている。こうして幼若な骨組織からも type I コラーゲンとは別に、あらたな特異なコラーゲン分子が見出されるに至っているが、こうしたコラーゲンの存在の生理的意義についてはいまだ不明であり、今後この点に関する研究がまたれるしだいである。

#### まとめ

ヒトの骨、関節軟骨において合成されるコラーゲンが、加齢とともにいかにその生化学的特性を変換せしめてゆくかについて論述し、また、コラーゲンの分子構造面での経年的変化についても要約して紹介した。これまで、ヒトの結合組織コラーゲンについてこのような検索を加えた報告はまったくみられない状態であり、今後、骨、関節の生理あるいは病態を基礎的見地から考えてゆくうえにおいて、筆者らの研究結果が何らかの役に立てば幸いである。

#### 文献

- 1) Bailey, A.J.: Purification of an acid  $\alpha$ -glucosidase by dextran-gel filtration. *Biochem. J.* 105: 35, 1967.
- 2) Banfield, W.G.: The solubility and swelling of collagen in dilute acid with age variation in man. *Anat. Rec.* 114: 157, 1952.
- 3) Bornstein, P. et al.: The nature and location of intramolecular cross-links in collagen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 55: 417, 1966.
- 4) Bosmann, H.B. et al.: Attachment of carbohydrate to collagen; isolation, purification and properties of the glucosyl transferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 30: 89, 1968.
- 5) Bulter, W.T. et al.: Evidence for the linkage of a disaccharide to hydroxylysine in tropocollagen. *J. Biol. Chem.* 241: 3882, 1966.

- 6) Elsdon, D.F. et al.: An investigation of pyridinoline, a putative collagen cross-link. *Biochem. J.* 185: 531, 1980.
- 7) Epstein, E.H. Jr.:  $[\alpha_1(\text{III})]_3$  Human skin collagen. *J. Biol. Chem.* 249: 3225, 1974.
- 8) Eyre, D.R. et al.: The distribution of different molecular species of collagen in fibrous, elastic and hyaline cartilages of the pig. *Biochem. J.* 151: 595, 1975.
- 9) Eyre, D.R. et al.: Types I and II collagens in intervertebral disc; interchanging radial distributions in annulus fibrosus. *ibid.* 157: 267, 1976.
- 10) 藤井克之ほか: ヒト骨および関節軟骨コラーゲンの老化の研究—cross-linkとそのprecursorの変化について。骨代謝 7: 80, 1973.
- 11) Fujii, K. et al.: Age-related changes in the reducible cross-links of human tendon collagen. *F.E.B.S. Lett.* 43: 300, 1974.
- 12) 藤井克之: ヒト骨、関節軟骨のコラーゲン架橋結合とaging. *整形外科基礎科学* 1: 154, 1974.
- 13) Fujii, K.: Aging of the collagen in human joint components; changes in the reducible cross-links and solubilities. *J. Jap. Orthop. Ass.* 49: 145, 1975.
- 14) Fujii, K. et al.: Aldehyde content and cross-linking of Type III collagen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 69: 128, 1976.
- 15) Fujii, K. et al.: Aging of human bone and articular cartilage collagen; changes in the reducible cross-links and their precursors. *Gerontology* 22: 363, 1976.
- 16) Fujii, K. et al.: Collagen fibrogenesis and the formation of complex crosslinks. *J. Mol. Biol.* 106: 223, 1976.
- 17) Fujii, K. et al.: Osteogenesis imperfecta; altered content of Type III collagen and proportion of the cross-links in skin. *F.E.B.S. Lett.* 82: 251, 1977.
- 18) Fujii, K. et al.: Osteogenesis imperfecta; biochemical studies of bone collagen. *Clin. Orthop.* 124: 271, 1977.
- 19) 藤井克之ほか: ヒト胎児骨コラーゲンの安定性と可溶性コラーゲンに対する検討。骨代謝 11: 372, 1978.
- 20) 藤井克之: 整形外科領域におけるコラーゲン研究の進歩。整形外科 29: 1077, 1978.
- 21) 藤井克之ほか: ヒト胎児の発育に伴う骨、軟骨、皮膚コラーゲンの生化学的变化について。整形外科基礎科学 5: 9, 1978.
- 22) Fujii, K. et al.: Maturation process of bone collagen during human embryonic growth. *Transactions of the 24th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society (U.S.A.)* 3: 59, 1978.
- 23) Fujii, K. et al.: Age-related changes in the reducible cross-links of connection from human skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 89: 1026, 1979.
- 24) Fujimoto, D. et al.: Isolation and characterization of a fluorescent material in bovine Achilles tendon collagen. *ibid.* 76: 1124, 1977.
- 25) Gross, J. et al.: Extraction of collagen from connective tissue by neutral salt solutions. *Proc. Natl.*

Acad. Sci. U.S.A. 41: 1, 1955.

26) Housley, T. et al.: Collagen crosslinking; isolation of hydroxyaldol-histidine, a naturally-occurring crosslink. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67: 824, 1975.

27) Kefalides, N.A.: Comparative biochemistry of mammalian basement membranes, *Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix*, Academic Press, London, Vol. 1, p. 535, 1970.

28) Kohn, R.R. et al.: Relationship of age to swelling properties of human diaphragm tendon in acid and alkaline solutions. *J. Gerontol.* 13: 241, 1958.

29) Kohn, R.R. et al.: Effect of age and heat on human collagenous tissue; studies on acid solubility, titration curves, and elasticity. *Arch. Pathol.* 68: 316, 1959.

30) Lenkiewicz, J.E. et al.: Collagen in human myocardium as a function of age. *Cardiovasc. Res.* 6: 549, 1972.

31) Miller, E.J. et al.: Chick cartilage collagen; a new type of  $\alpha_1$  chain not present in bone or skin of the species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 64: 1264, 1969.

32) Miller, E.J. et al.: Identification of three genetically distinct collagens by cyanogen bromide cleavage of insoluble human skin and cartilage collagen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42: 1024, 1971.

33) Miller, E.J.: Isolation and characterization of a collagen from chick cartilage containing three identical  $\alpha$  chains. *Biochemistry* 10: 1652, 1971.

34) Morgan, P.H. et al.: A comparative study of glycopeptides derived from selected vertebrate collagens; a possible role of the carbohydrate in fibril formation. *J. Biol. Chem.* 245: 5642, 1970.

35) Pinnel, S.R. et al.: The cross-linking of collagen and elastin; enzymatic conversion of lysine in peptide linkage to  $\alpha$ -aminoadipic- $\gamma$ -semialdehyde (Allysine) by an extract from bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 61: 708, 1968.

36) Rasmussen, D.M. et al.: Isotonic and isometric thermal contraction of human dermis; II. age-related changes. *J. Invest. Dermatol.* 43: 341, 1964.

37) Rhodes, R.K. et al.: Physicochemical characterization and molecular organization of the collagen A and B chains. *Biochemistry* 17: 3442, 1978.

38) Rubin, A.L. et al.: Effect of pepsin treatment on the interaction properties of tropocollagen macromolecules. *ibid.* 4: 181, 1965.

39) Siegel, R.C.: Biosynthesis of collagen crosslinks; increased activity of purified lysyl oxidase with reconstituted collagen fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71: 4826, 1974.

40) Spiro, R.G. et al.: Studies on the biosynthesis of the hydroxylysine-linked disaccharide unit of basement membranes and collagens; III. tissue and subcellular distribution of glycosyl-transferases and the effect of various conditions on the enzyme levels. *J. Biol. Chem.* 246: 4919, 1971.

41) Tauzer, M.L.: Collagen crosslinks; stabilization by forohydride reduction. *Biochem. Biophys. Acta* 133: 584, 1967.

42) Tanzer, M.L.: *Cross-linking, Biochemistry of Collagen*, Plenum Press, New York-London, p. 137, 1976.

43) Uitto, J.: Collagen Polymorphism; isolation and partial characterization of  $\alpha_1(1)$ -Trimer molecules in normal human skin. *Arch. Biochem. Biophys.* 192: 371, 1979.

ISO

慶大整形外科・浜野恭之先生御指導

化膿性骨髓炎および

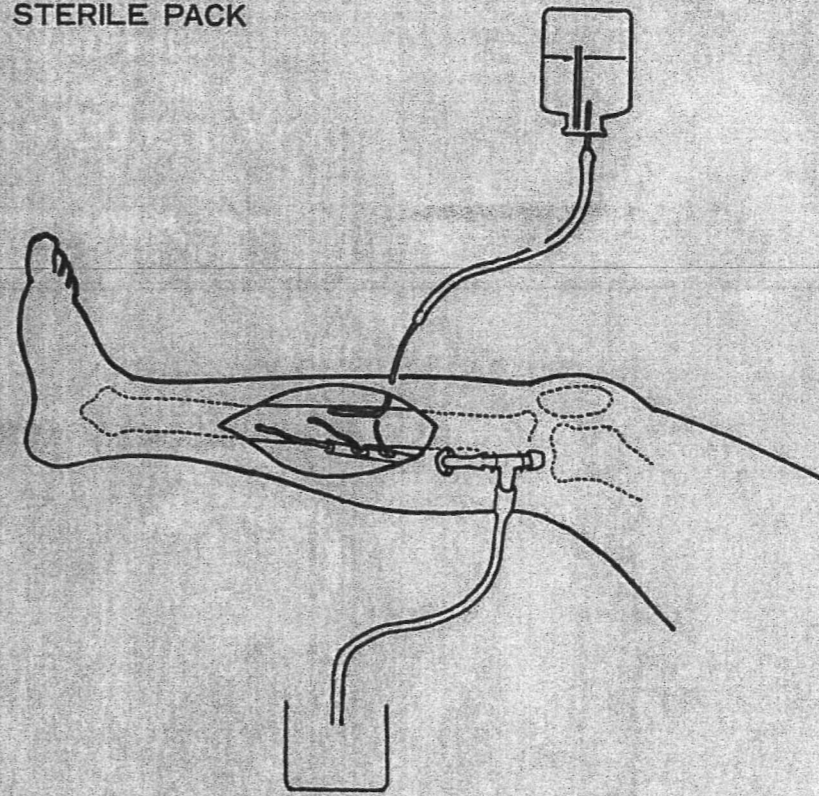
その他の細菌感染創治療に!!

# 浜野式 イリゲーション チューブ

—閉鎖性局所持続洗滌用チューブ—

(実用新案登録済)

STERILE PACK



病巣搔爬後の閉鎖性局所持続洗滌法に、持続吸引器等の特別の器具を用いず創内を陰圧に保ち、洗滌を持続させます。創内死腔の減少、術後血腫除去、病的産物の排出により、感染創治療が容易になります。

株式会社 磯医科器械店

〒113 東京都文京区本郷2丁目11-7  
TEL 03(814) 7885 (代表)