

氏名(本籍)	富田 美穂子 (岐阜県)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第 535 号
学位授与日付	平成 15 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Observation for the redox state of human synovial fluid albumin from patients with temporomandibular joint disorders
審査委員	(主査) 教授 恵 良 聖 一 (副査) 教授 岡 野 幸 雄 教授 柴 田 敏 之

## 論文内容の要旨

血清アルブミンは、N末端から34番目のSH基がフリーな状態の還元型アルブミン (human mercaptalbumin, HMA) と、このSH基が血中の含硫アミノ酸などと結合した酸化型アルブミン (human nonmercaptalbumin, HNA) との混合物よりなり、両者の割合のバランスによって生体内の酸化還元緩衝機構の一翼が担われている。今回申請者らは、ヒト顎関節症の発症における活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) の関連性を研究するために、高速液体クロマトグラフィー (high-performance liquid chromatography, HPLC) を用いてヒト顎関節滑液中のアルブミン分子の酸化還元状態解析を行い、さらに、電子スピン共鳴 (electron spin resonance, ESR) 装置を用いて患者滑液中のROS、とくにスーパーオキシド( $O_2^-$ )の存在の有無を検討した。

### 対象と方法

本研究に同意が得られた顎関節症患者女性14名 (平均年齢, 23.2 ± 4.8歳) を患者群, 健康成人女性8名 (平均年齢, 19.8 ± 0.5歳) をコントロール群とした。耳前部を消毒後0.5 ml Xylocaineで浸潤麻酔をかけ、2.0 mlの生理食塩水を上関節腔内に注入し、希釈された顎関節滑液を採取し、この滑液と同日に採血して得られた血清を分析試料とした。

アルブミンの酸化還元状態解析は、陰イオン交換カラム (Shodex-Asahipak ES-502N) を装備したHPLCによって行った (カラム温度, 35°C; 溶出液, 0.05 M 酢酸ナトリウム-0.40 M硫酸ナトリウム (pH 4.85); エタノール濃度勾配, 0-10%; 注入量, 2  $\mu$ l (血清) と50  $\mu$ l (滑液); 蛍光検出, 280nm (励起波長), 340nm (検出波長))。得られたHPLCプロファイルのアルブミン分画の各ピークに対してガウス近似を行い、HMAおよびHNAの割合 (%) を算出した。

患者滑液中のROSの検出には、 $H_2O_2 \rightarrow O_2^-$ なる反応で生じる $O_2^-$ を検出するpHジャンプESR法 (Fujii & Kakinuma, 1990) を用いた。すなわち、上述のように採取した患者滑液に強アルカリ (5.0 M NaOH) を混和した混合溶液を三等分した後、それぞれを混和後1, 15, 30分経過した後直ちに液体窒素で凍結させ、ロックインアップを組み込んだ標準X-バンドESR装置 (日本電子社, JES-FE1X) にて $O_2^-$ シグナルを検出した (測定温度, -196°C)。 $O_2^-$ に由来するESRシグナルの確認には、[5.0 mM  $H_2O_2$ -1.0 M NaOH]溶液を用いて行った。

### 結果

#### 1. HPLC法による血清および滑液中のアルブミンの酸化還元状態解析

アルブミン分画のうち酸化型アルブミン、すなわちHNAは血中のシスチンやグルタチオンが結合したHNA (Cys) やHNA(Glut), SH基がさらに酸化されてスルフェン酸, スルフィン酸, スルホン酸の状態になった不可逆的な酸化型アルブミン (HNA(Oxi)) など数種類が存在する (本HPLC法では、[HNA(Cys) & HNA(Glut)] とHNA(Oxi)とが分離・観測されるので、それぞれをHNA-1, HNA-2とよぶ)。

患者群の血清中のHMA, HNA-1, HNA-2の割合はそれぞれ, 79.1 ± 1.5, 18.9 ± 1.4, 2.0 ± 0.2 % (平均値 ± SEM), コントロール群の血清中のそれらはそれぞれ, 81.2 ± 1.0, 16.7 ± 0.9, 2.2 ± 0.2%であった。一方患者群の

滑液中のそれらはそれぞれ、 $66.1 \pm 2.6$ ,  $30.9 \pm 2.4$ ,  $3.0 \pm 0.3$  %, コントロール群は $70.4 \pm 1.6$ ,  $28.0 \pm 1.6$ ,  $1.7 \pm 0.1$  %であった。両群とも滑液中のHMAの割合は血清中よりも低値を示し、それに伴って滑液中のHNAの割合は血清中よりも高値を示した。特にHNA-2の割合は有意に高値であった( $P < 0.001$ )。

## 2. ESRによる患者滑液中のROS, 特に $O_2^-$ シグナルの検出

患者滑液を試料としてESR測定を行う前に、まず $[5.0 \text{ mM } H_2O_2 - 1.0 \text{ M NaOH}]$ 溶液を用いて $O_2^-$ に由来するESRシグナルの同定を行った。その結果、磁場強度が332 mTの位置に $g$ 値が2.005という $O_2^-$ に由来するESRシグナルを確認した。患者滑液も同様の条件にて測定したが、シグナル強度は弱かったものの、同様のESRシグナルが観測され、患者滑液中に $O_2^-$ に由来するシグナルが確認できた。

さらに、採取した患者滑液に強アルカリ (5.0 M NaOH) を混和した混合溶液を三等分した後、それぞれを混和後1, 15, 30分経過した後に直ちに液体窒素で凍結させた試料を測定した。その結果、凍結までの時間が長い試料ほど、そのESRスペクトルの積分値は大きくなった。

## 考察

ヒト顎関節症の発症に、メカニカルストレスや虚血再灌流に起因するROSの関与が示唆されている。血清アルブミンはヒトの体液中に遍く存在して生体内の酸化還元緩衝機構に関与していると考えられているので、まず、顎関節症患者の滑液中のアルブミンの酸化還元状態をHPLCによって分析した。その結果、患者群とコントロール群の両群ともに滑液中のHNA値は血清に比して高値を示したことから、顎関節腔内は正常・病的状態にかかわらず、極小閉鎖空間のために血管内よりも酸化状態であると考えられた。さらに、特に患者滑液中のHNA-2が有意に高値を示したことから、患者滑液中のアルブミンは関節腔内に発生したROSによって還元型から不可逆的な酸化型アルブミンに変換されていると考えられた。

ROSの直接的観察手法として、化学発光法やESR法などが知られている。ESR法はROSのうち不対電子を持つフリーラジカルを検出できるため、今回pHジャンプESR法を用いて $H_2O_2$ に由来する $O_2^-$ ラジカルの検出を試みた。すなわち採取した患者滑液に強アルカリを混和し、 $O_2^-$ 分子を安定化させた後ESR測定を行った。その結果、シグナル強度は弱かったものの磁場強度が322 mTの位置に $g$ 値が2.005のESRシグナルが観測された。さらに、このシグナル強度の積分値が液体窒素による試料凍結までの時間に対して経時的に増加したことから、このシグナルは明らかに患者滑液内に発生した $O_2^-$ に由来すると考えられた。

以上の研究結果から、疾患発症機構の詳細は明らかではないが、産生されたROSがヒト顎関節症の発症に何らかのかたちで関与していると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

申請者 富田美穂子は、酸化型アルブミンと還元型アルブミンとが分離・観測可能な特殊なカラムを装備したHPLCによって、正常人および顎関節症患者の血清ならびに顎関節滑液中の両アルブミンの割合を比較検討した結果、患者滑液中には特に不可逆的な酸化アルブミンが有意に増加していることを見いだした。さらに、フリーラジカルを直接測定可能なpH-ジャンプESR法を用いて患者滑液中にスーパーオキシドの存在を確認した。これらの研究結果は、ヒト顎関節症の発症において活性酸素種の関与を強く示唆したもので、生理学、とくに口腔生理学の発展に少なからず寄与するものと認められる。

---

[主論文公表誌]

Observation for the redox state of human synovial fluid albumin from patients with temporomandibular joint disorders.

Acta Sch Med Univ Gifu 2003; 51: 21-28