

ヒアルロン酸とコンドロイチン硫酸の相互作用に関する研究

西 村 正 宏

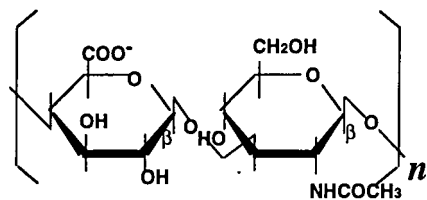
Interactions Between Hyaluronan and Chondroitin Sulfate in Solution

Masahiro Nishimura

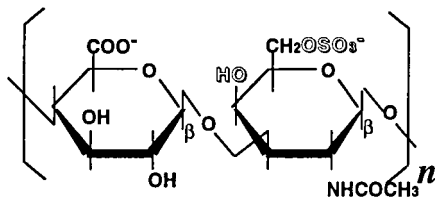
(平成9年1月13日受付)

緒 言

ヒアルロン酸 (HA) は図 1 に示すように D-glucuronic acid と N-acetyl glucosamine が β 1-3 結合した二糖単位が多数 β 1-4 結合した一本鎖多糖体で、軟骨、臍帯、硝子体、関節液等に高濃度で存在する他、全身のほとんどの組織に様々な濃度で分布する¹⁾。HA とコンドロイチン硫酸 (CS) はグリコサミノグリカン



hyaluronic acid (HA)



chondroitin-6-sulfate (C6S)

図 1 ヒアルロン酸とコンドロイチン硫酸の構造。

(GAG) の一種でその構成二糖単位は非常によく似た構造であるが、CS は N-acetyl glucosamine の 4 位の水酸基の向きが逆である、6 位あるいは 4 位に硫酸基がついている点が異なっている。それ以外には、CS 等の他の GAG が 20-80 kDa かそれ以下の分子量であるのに対して、HA は 2000 kDa もの高分子であるという特徴をもつ。HA は溶液中で様々な分子形態をとり、X 線解析や NMR 解析によりカルシウム存在下では HA の 2 糖が 3 単位で 1 回転の螺旋構造をとることや、水溶液中で分子全体としてランダムコイル状を呈することが報告されている^{2,3)}。HA は細胞間隙に水を保持し、細胞間にゼリー状のマトリックスを形成して細胞間の物質移動を制御するほか⁴⁾、創傷治癒初期での出現⁵⁾、間葉系細胞の軟骨細胞への分化前段階での出現⁶⁾、またリンパ球系細胞に対する多様な作用⁷⁾など、生体防御機構の 1 つとしても重要な役割を果たしている。さらに HA は軟骨中で、コア蛋白とそれに共有結合する約 50 本の CS 鎖と約 20 本のケラタン硫酸鎖からなる PG の一種であるアグリカンモノマーとコア蛋白の G1 ドメインで結合し、巨大な HA-アグリカン凝集体として軟骨の弾力性に寄与する⁸⁻¹⁰⁾。

また HA は酸性基を多数持つために水によく溶け、水溶液中ではその高分子性の為に高い粘性を示し、特に関節においては関節液の粘度を決定する主要成分である。健全な膝関節液中の HA の含量は、健常若年者では約 4 mg/ml、高齢者になると約 1.5 mg/ml で、分子量は年齢に関係なく約 2000 k から 4000 kDa であるとされている。しかし関節炎では HA の分子量も濃度も低下し、その結果粘度が低下する^{11,12)}。一方高分子 HA は低分子 (<30-300 kDa) HA と異なり関節炎に対し、鎮痛作用、可動域の増加等の治療効果を示し、整形外科領域で臨床応用されている^{13,14,16-18)}。これらの HA の効果は HA の分子量の増加とともに

広島大学歯学部歯科補綴学第二講座 (主任: 濱田泰三教授) 本論文の要旨は平成 8 年 5 月の第 95 回日本補綴歯科学会学術大会, 平成 8 年 6 月の第 29 回広島大学歯学会総会において発表した。

より強くなる^{14-16,19,20}。しかし HA の作用機構については、未だ完全には解明されていない。これまでの HA の作用機構に関する報告をまとめると、HA 自身の粘性による機械的な弾力性、潤滑性の改善²¹、HA の細胞膜上レセプターである CD44 や RHAMM を介した生物学的作用²²⁻²⁵、炎症性因子の抑制作用²⁶、プロテオグリカン (PG) の遊離を抑制する軟骨の保護作用²⁷などが挙げられる。HA はアグリカン^{8,9}やパーシカン²⁸などの PG、細胞性フィブロネクチン²⁹等と HA-蛋白質間で結合することは知られているが、その他の非蛋白性細胞外基質、特に糖鎖と HA との結合に関する研究はない。

HA が相互作用する分子を解明することは関節液の潤滑作用だけでなく、広く全身の細胞外基質の構築と変更のメカニズムを知る上で重要である。そこで、本研究では様々な非蛋白性細胞外基質、特に生体内 GAG のなかで最も主要な CS について、HA との混和溶液の粘度を二種類の粘度計を用いて測定することにより CS が組織・体液の粘性に関与しうるか否かを検討した。

材料ならびに方法

1. 試 薬

各種の分子量 (50 k, 100 k, 300 k, 800 k, 1900 kDa 相当) の HA ナトリウム (電気化学工業社製) は日本セルより提供された。実験 1 の CS には異性体の構成比は不明だが、量的に大量に入手可能な CS ナトリウム (片山化学工業社製) を用いた。実験 2 ではより精度の高い測定のため、サメ軟骨から精製したコンドロイチン 4 硫酸とコンドロイチン 6 硫酸を 1:9 の割合で含有し、蛋白の含有率は 0.03% 以下のコンドロイチン硫酸 C を用いた。アグリカンモノマー (アグリカン) はブタ関節軟骨の 4M グアニジン塩酸抽出液から Hascall と Heinegård の方法^{8,9}に基づき CsCl 溶液中の遠心により A1-D1 画分を得た。この画分を蛋白分解酵素阻害剤を含む水に対して数回交換して 36 時間透析した後凍結乾燥した。この方法により HA 結合ドメインをもつアグリカンモノマーが精製できる。またデキストラン (70 kDa 相当) は和光純薬工業社より、ウシ血清アルブミン (BSA) は片山化学工業より購入した。

HA および PG、各種糖、BSA は使用の 16 時間前に PBS (Ca, Mg-free, pH 7.4) に緩やかに溶解した。

2. ウペローデ毛細管型粘度計による粘度の測定

従来から蛋白質、核酸、多糖類の粘度を測定するためには毛細管粘度計が用いられている。今回は粘度の

低い溶液を測定するために概略定数 0.00287 (cSt/s) のウペローデ型粘度計を用いた。測定方法としては約 20 ml の溶液を上刻線まで吸い上げ、それを自由落下させ、下刻線を通るまでの時間 t を測定する。溶液が溶媒の比重にほぼ等しいとき同様に測定した溶媒の通過時間を t_0 とすると、その溶液の比粘度は、

$$(t-t_0)/t_0$$

として求められる。今回用いた最大濃度の溶液において、溶液と溶媒との間に比重の違いは認められなく、この式が成立する。溶媒には Mg, Ca を含まないリン酸緩衝溶液 (PBS) を用い、37°C にて測定を行った。

3. CSL-500 型ストレス制御式レオメーターによる粘度の測定

運動時に大きなせん断力がかかる関節液のような組織・体液の粘度の測定には、せん断速度の変化を考慮する必要がある。その原理は図 2 に示すようにニュートンの法則にさかのぼる。つまり流れている流体を解析するために、平行な 2 枚の流体平面を想像するとき、上面に F という力が加わると、上面は下面に比べて v だけ速い速度で滑る。力を加える面積が広いほど大きな力が必要になるので、この力 F を単位あたりの面積 A に換算したものがせん断応力 (shear stress) である。またそのときの速度 v を流体の厚み d で除したものがせん断速度 (shear rate) で、粘度は

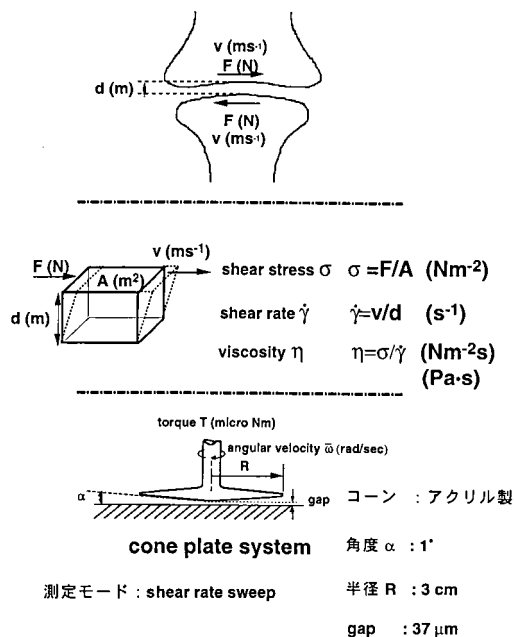


図 2 測定原理と測定条件。

せん断応力をせん断速度で除することにより表せるので、単位は応力の単位である Pa に、移動時間 s を乗じたものになる (図 2)。HA や他の GAG の PBS 溶液を各濃度まで十分混合して、 37°C で 1 時間放置した後、500 g で 10 分間遠心して気泡を除き、CSL500 型ストレス制御式レオメーター (Carri-Med Ltd., Glebelands centre, Dorking, Surrey, RH4 3YX, England) にて粘度を測定した。測定モードは shear rate sweep を使い、測定システムにはコーンプレートタイプを使い、コーンは Acrylic 5663 (cone angle は 1° 、直径 6.0 cm) を使用し、measurement system gap は装置の設定に従い $37\ \mu\text{m}$ に設定した (図 2)。円錐の角度や直径、試料の厚さ等のパラメーターと、設定したせん断速度を得るために必要なせん断応力を IBM 社製 PS/V コンピューターと Controlled Stress Rheometer Software Ver. 5.5 (Carri-Med Ltd.) を用いて随時計算し粘度を測定した。なお測定温度は常に 37°C で行い、溶液の添加時には気泡が入らぬように細心の注意を払った。

予備実験としてせん断速度を上昇させる時間を検討したところ速く上昇させてもゆっくり上昇させても粘度変化は同様の軌跡を示したので主な実験は 30 秒間での上昇時間で行った。また全ての実験について 3 回以上の測定を行い、それらの平均値を結果とした。

結 果

1. ウペローデ型毛细管粘度計による粘度測定結果

はじめに HA とコンドロイチン硫酸あるいはアグリカンの結合が、混和後どれくらいで平衡に達するかを調べたところ、混和終了後 15 分以降には粘度が平衡に達していた。そこで混和後 37°C において 15 分以上試料を平衡化させた後に各試料の粘度を測定した。

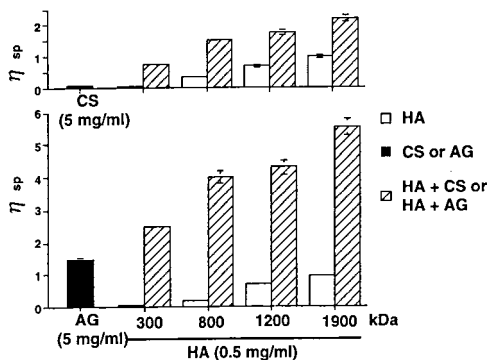


図 3 アグリカン、CS (5 mg/ml) と HA (0.5 mg/ml) の共存による粘度の上昇におよぼす HA の分子量の影響。

HA 単独溶液の比粘度は HA の分子量に依存して上昇した (図 3)。またアグリカンを混和した HA 溶液は、HA とアグリカンの比粘度の相加以上の比粘度を示した (図 3)。一方、CS も HA 溶液の比粘度を上昇させた。HA (0.5 mg/ml)-CS (5 mg/ml) の混和溶液は HA (0.5 mg/ml)-アグリカン (5 mg/ml) の混和溶液の約 40% の比粘度を示した。

次に HA (0.5 mg/ml) 溶液の粘度に及ぼす各種の濃度の CS の影響について検討した。CS 単独の粘度は 10 mg/ml においても非常に低いに関わらず、CS (10 mg/ml) は 300 および 1900 kDa の HA 溶液の比粘度をそれぞれ約 3 および 2 倍上昇させた (図 4)。この CS による粘度上昇効果は 1 mg/ml から検出され、少なくとも 10 mg/ml まで濃度依存的に増加した (図 4)。

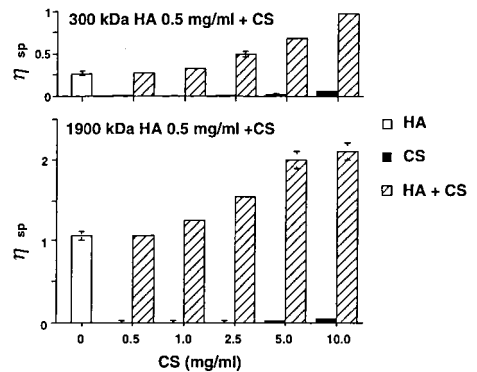


図 4 各種の濃度のコンドロイチン硫酸の HA (300 kDa, 1900 kDa: 0.5 mg/ml) の粘度に及ぼす影響。

2. 各種せん断速度における HA 溶液の粘度に及ぼす CS の影響

次に流体中での HA 溶液の粘度に及ぼす CS の影響を各せん断速度で検討した。CS 単独溶液の粘度は測定した全てのせん断速度 ($3\text{--}1500\ \text{s}^{-1}$) において低かった (図 5)。一方、800 kDa HA 溶液 (4 mg/ml) は低せん断速度で粘度が高くせん断速度の上昇とともに粘度が低下する非ニュートン性の挙動を示した。

800 kDa HA 溶液への CS (10–40 mg/ml) の添加は濃度依存的に HA 溶液の粘度を特に低せん断速度で上昇させ、非ニュートン性をより顕著にさせた。

せん断速度の上昇により HA 溶液の粘度が低下するのは分子内、分子間相互作用による架橋が壊され、せん断により巨大な HA 分子が流れに沿って並ぶためであると推察されている³⁰⁾。実際、HA および HA-CS 溶液を繰り返し本粘度計にかけて測定しても、粘

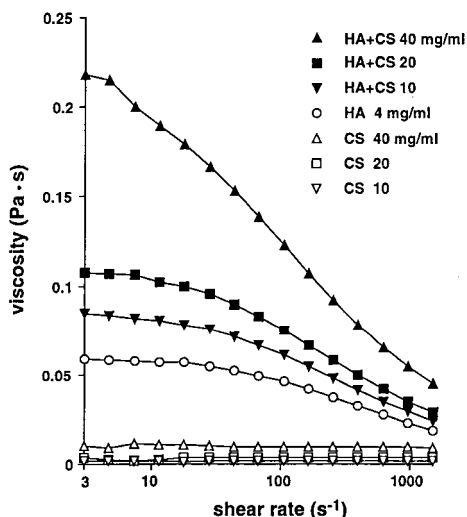


図5 様々なせん断速度におけるコンドロイチン硫酸のHA溶液の粘度におよぼす影響。

800 kDa HA 溶液 (4 mg/ml) 単独あるいは10, 20, 40 mg/ml のコンドロイチン硫酸溶液単独, さらにそれぞれを混和した溶液をせん断速度 $3\text{--}1500\text{ s}^{-1}$ において測定した。

度は可逆的に回復し, 分子そのものの破壊や, 凝集の破壊は観察されなかった。

次に 800 kDa HA の濃度を 2 から 8 mg/ml まで上昇させ, 各せん断速度における粘度を測定した (図6)。HA 溶液の粘度は全てのせん断速度で濃度依存的に上昇した。また CS は各種濃度の HA 溶液の粘度を 2.6–3.3倍上昇させた。2 および 4 mg/ml の低濃度では HA 溶液の粘度は非常に低いので拡大図として図

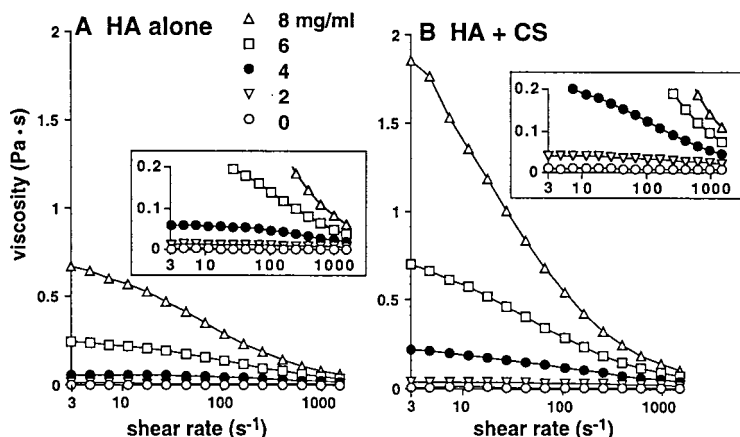


図6 様々な濃度の HA 溶液に対するコンドロイチン硫酸の粘度におよぼす影響。

A: 800 kDa HA 単独溶液 (0–8 mg/ml)。

B: A と同条件に対してコンドロイチン硫酸 (40 mg/ml) を添加した溶液の粘度変化。

6 に挿入した。これらの結果は, CS が HA の広い濃度範囲で HA 溶液の粘度を上昇させることを示している。

なお溶媒として PBS のかわりに生理食塩水あるいは 0.1 M Tris-HCl (pH 7.4) 緩衝液を用いても本条件下では混和溶液の粘度はほとんど変化しなかった。

3. 流体中での HA 溶液の粘度におよぼす CS とアグリカンの影響の比較

アグリカンを多量に精製することは困難なので, 本実験では, CS とアグリカンをそれぞれ 10 mg/ml になるように HA 溶液に添加した。10 mg/ml のアグリカン溶液の粘度は測定した全てのせん断速度において低値を示した (図7)。一方, 800 kDa HA (5 mg/ml) とアグリカン (10 mg/ml) の混和溶液はせん断速度に依存して粘度が低下する非ニュートン流体の挙動を示した (図7)。HA とアグリカンの混和溶液のせん断速度による粘度変化曲線は, HA と CS の混和溶液のそれとは異なっていた (図7)。アグリカンを HA に混和した溶液は, せん断速度 $3\text{--}11\text{ s}^{-1}$ において急速な低下を, そして 100 s^{-1} で肩状を示した。以前の研究においても, HA-アグリカン溶液のせん断速度依存性粘度曲線が同様の肩状を示している^{30,31}。アグリカン (10 mg/ml) の HA 溶液への粘度上昇効果はせん断速度 $3\text{--}7\text{ s}^{-1}$ において CS (10 mg/ml) より強力であった (図7)。一方, せん断速度 $11\text{--}67\text{ s}^{-1}$ では CS-HA 溶液の粘度が僅かに高くなり, 高せん断速度 ($>67\text{ s}^{-1}$) ではアグリカン-HA 溶液の粘度の方が僅かに高くなった。

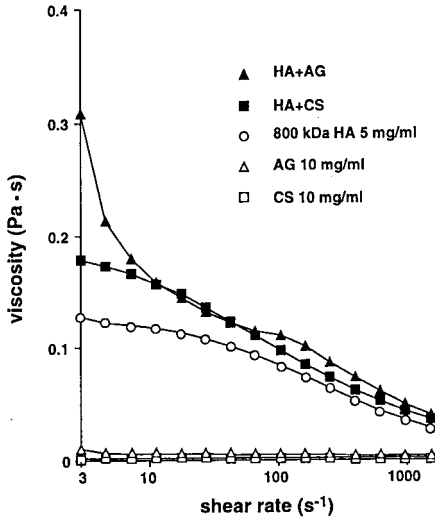


図7 様々なせん断速度におけるコンドロイチン硫酸とアグリカンのHA溶液の粘度におよぼす影響の比較。

800 kDa HA 溶液 (5 mg/ml) 単独, 10 mg/ml コンドロイチン硫酸, アグリカン溶液単独, さらにそれぞれを混和した溶液をせん断速度 3-1500 s^{-1} において測定した。

4. アグリカンとCSの粘度上昇効果の各濃度における比較

図8は低せん断速度 ($3 s^{-1}$) における 800 kDa HA (5 mg/ml) 溶液の粘度に及ぼす各種濃度のアグリカンとCSの影響を示す。アグリカン, 2-10 mg/ml とCS, 2-40 mg/ml の濃度範囲において各混和溶液の粘度はアグリカンあるいはCSの濃度の上昇とともにほ

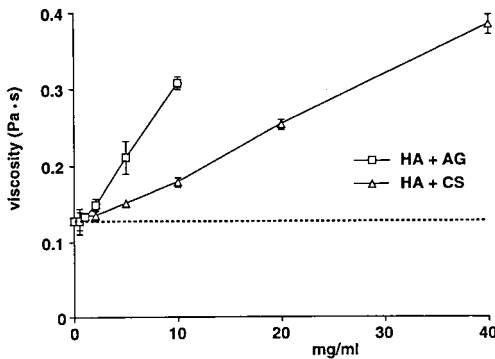


図8 アグリカンとコンドロイチン硫酸の様々な濃度の違いによるHA溶液の粘度におよぼす影響。

せん断速度 $3 s^{-1}$ において, 800 kDa HA 溶液 (5 mg/ml) 溶液にアグリカン (0.5-10 mg/ml), コンドロイチン硫酸 (0.5-40 mg/ml) を混和した溶液の粘度をそれぞれ比較した。

は比例的に増加した。またアグリカンと同等の粘度上昇効果を得るためにCSはアグリカンの約2.8倍の濃度を必要とした(図8)。一方, 中程度のせん断速度 $17 s^{-1}$ においては各種濃度でCSはアグリカンと同等のHA溶液粘度上昇効果を示した。さらに速いせん断速度 ($1500 s^{-1}$) では, アグリカンと同等の粘度上昇効果を得るためにCSはアグリカンの約1.3倍の濃度を必要とした(データ示さず)。

考 察

従来, CSは単独で粘度が低いため生体組織あるいは体液の粘度の調節に関与するとは考えられていなかった。またCSが生体内で最も主要なGAGの一つであるにも関わらず, このGAGのHA溶液に対する効果を検討した研究は見当たらない。CSは同一組織の中でも特定の部位に高濃度で局在し, しかもある種の細胞は様々な刺激に応答してCSを活発に合成するので, 本研究では広い濃度範囲 (0.5-40 mg/ml) のCSを用いた。一方, HAの分子量はヒト関節軟骨では2.5歳から86歳の間に2000 kDaから300 kDaまで減少する^{12,32)}。また滑液のHAの濃度は1.5-4 mg/mlで, 加齢や関節炎において減少する¹⁰⁾。さらに他の組織・体液においてもHA濃度は発生, 加齢, 炎症, 組織改築の過程で大きく変化する。したがって本研究では各種の分子量 (50-1900 kDa) のHAを0.5-8 mg/mlの広い濃度で用いた。

本研究では2種類の粘度計を用いて, CS単独の粘度は非常に低いにも関わらず, 生理的条件下 ($37^{\circ}C$, pH 7.4) でかつ生理的GAG濃度でCSがHA溶液の粘度を著明に上昇させることを明らかにした。この知見は, HAビーズとCSビーズの特異的な凝集を報告したTurleyらの結果と一致している³³⁾。しかしTurleyらの実験は人工的にGAGをビーズに固定してあるために, CSビーズに結合するHAの結合能力をアグリカンビーズとは比較しておらず結合の定量的解析もしていない。

一方本研究では, CSは低せん断速度 $3 s^{-1}$ と高せん断速度 $1500 s^{-1}$ においてはアグリカンに比べそれぞれ2.8倍と1.3倍の濃度があれば, アグリカンと同様のHA溶液粘度上昇効果を示すことが示された(図8)。またウベローデ粘度計による結果では, CS (5 mg/ml)-HA (0.5 mg/ml) 混和溶液の粘度はアグリカン (5 mg/ml)-HA (0.5 mg/ml) 混和溶液の粘度の約40%であった(図3)。さらに中程度のせん断速度 ($11-67 s^{-1}$) においてCSはアグリカンと同程度のHA溶液の粘度上昇効果を示した(図7)。これらの知見は, CSはアグリカンとともに組織・体液の粘度を静

的・動的状態において調節していることを強く示唆している。

CS 溶液とアグリカン溶液の粘度はせん断速度により変化しないのに対して CS あるいはアグリカンを混和した HA 溶液は非ニュートン性を示した (図 7)。せん断速度を 3 から 11 s^{-1} に増加させると, HA-アグリカン溶液は HA-CS 溶液に比べ, 急速に粘度が減少した (図 7)。HA-アグリカン溶液のせん断速度 $3\text{--}11 \text{ s}^{-1}$ の急速な粘度の減少はコーンプレート型粘度計のせん断力により HA-アグリカン複合体が流れに沿って整列するためと考えられる。さらに HA-アグリカン溶液は HA-CS 溶液と異なりせん断速度 100 s^{-1} 付近で広い肩状を示した (図 7)。このことは HA-CS 溶液と HA-アグリカン溶液の粘性の質的違いを示し, アグリカンと CS が生体体液の粘度調節に異なった役割を果たしていることを示唆している。

関節液のように高分子 HA を含む溶液の粘度はせん断速度の上昇とともに減少する。関節液のこの非ニュートン性は運動時の円滑な関節面の滑りに必須である。一方, せん断のかからない状態での滑液の高粘性は関節を安定させ, 荷重と機械的ストレスの吸収に役立つ³⁴⁾。関節炎での滑液中の HA の濃度と分子量の低下は関節機能を傷害し, したがって高分子 HA の関節腔内投与は関節炎に対して有効である。

しかし高分子 HA だけでは関節潤滑を十分に説明できない。関節軟骨の表面ではコラーゲンを含まない CS:HA を 9:1 で含む薄い高粘度の層が存在する^{35,36)}。この高粘度層は軟骨表面の微細な凸凹を平滑にするために役立つ。したがってこの高粘度層を除去すると関節の摩擦抵抗は著明に増加し³⁷⁾、健全な滑液や HA 溶液を添加しても摩擦抵抗は正常レベルまでには回復しない。関節表面にゆるく付着している CS やアグリカンが滑液中の HA と相互作用して非ニュートン性の高粘度膜を形成していると考えられる。この高粘度膜に G1 ドメインを持たない低分子 PG がアグリカンに対してどれくらいの比率で含まれているかは不明である。しかし半月板や関節軟骨の表層では関節軟骨内部よりもアグリカンの比率が低下することから³⁸⁾、関節潤滑における CS と HA の糖-糖間相互作用がより重要であると考えられる。

CS が HA 溶液の粘度を上昇させる機構については不明である。HA はそれ自身でも可逆的なポリマーのネットワークによる複合的なレオロジカルな特徴を持ち, HA の鎖が特異的に会合してもつれあうと報告されている^{39,40)}。また互いの HA 分子の間の水酸化メチル基とカルボキシル基との間で水素結合が起こりうることも考えられている⁴¹⁾。生体内にはコンドロイチン

硫酸 C 以外にもその異性体のコンドロイチン硫酸 A, デルマタン硫酸, ヘパリンなど多くの種類の GAG が存在するが, 同一分子量のこれらの GAG を得ることは困難なので, 本研究で HA 溶液に対するコンドロイチン硫酸 C (40 kDa) の効果を他の GAG と比較することは出来なかった。しかし, デキストラン (60 kDa) や BSA (69 kDa) は CS よりも分子量が高いにも関わらず HA 溶液の粘度に影響を及ぼさなかった。

HA はいくつかの糖単位を認識する HA 受容体を介して様々な生物学的活性を持ち, 高分子 HA は眼の手術において角膜保護剤として用いられ⁴²⁾、さらに薬の徐放剤としての用途も検討されている⁴³⁾。CS が HA 溶液の粘度を著明に増加させることは, 高分子 HA のこれらの薬理作用を理解する上でも重要な示唆を与えるであろう。

最近, CD44 を高レベルに発現している線維芽細胞培養系において, コンドロイチナーゼ ABC にて CS を分解すると HA を介する細胞凝集や細胞接着が著しく減少すること⁴⁴⁾、CD44 の GAG 付加部位のアミノ酸配列を変異させた CD44 は HA との相互作用が減少することが報告された⁴⁵⁾。この知見は HA による細胞凝集と接着には少なくともある状況下では CS が関与している事を示唆している。

結 論

1. CS 自身はほとんど粘度がないにもかかわらず, 広い範囲のせん断速度においてアグリカンに匹敵する HA 溶液粘度上昇作用を示した。
2. CS は 37°C で, 生理的 pH, 生理的食塩濃度で HA 溶液の粘度を最大 3.3 倍まで上昇させた。
3. HA-CS の相互作用は生体組織に存在する GAG 濃度で観察された。
4. HA-CS 溶液と HA-アグリカン溶液の粘度のせん断速度依存性は異なっていた。

以上の結果より, CS が生体組織および体液の粘性の調節に関与していることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 終始御聖篤なる御指導ならびに御校閲を賜りました本学歯科補綴学第二講座濱田泰三教授および口腔生化学講座加藤幸夫教授に感謝致します。さらに論文作成上, 御助言を賜りました本学歯科理工学講座山木昌雄教授に深謝致します。また本研究遂行上御協力, 御助言頂いた口腔生化学講座能城光秀助教授, 河本健博士, Yan Weiqun 博士, 大宅芳枝博士, 橋本和人博士, 理学部有機化学講座笛吹修治助教授, 日本ルセル株式会社薬剤本部小松修一博士, 電

気化学工業株式会社総合研究所三好照三博士にも感謝致します。最後に本研究を進める際に多大なる御支援を頂いた本学歯科補綴学第二講座ならびに口腔生化学講座の教室員の方々に心から感謝致します。

文 献

- 1) Laurent, A.E.: The Biology of Hyaluronan (Laurent, T.C., editor). Wiley, UK, 233-247, 1989.
- 2) Holmbeck, S.M., Petillo, P.A. and Lerner, L.E.: The solution conformation of hyaluronan: a combined NMR and molecular dynamics study. *Biochemistry* **33**, 14246-14255, 1994.
- 3) Winter, W.T. and Arnott, S.: Hyaluronic acid: the role of divalent cations in conformation and packing. *J. Mol. Biol.* **117**, 761-784, 1977.
- 4) Toole, B.P.: Developmental role of hyaluronate. *Connect. Tissue Res.* **10**, 93-100, 1982.
- 5) Oksala, O., Salo, T., Tammi, R., Hakkinen, L., Jalkanen, M., Inki, P. and Larjava, H.: Expression of proteoglycans and hyaluronan during wound healing. *J. Histochem. Cytochem.* **43**, 125-135, 1995.
- 6) Iwata, H. and Urist, M.R.: Hyaluronic acid production and removal during bone morphogenesis in implants of bone matrix in rats. *Clin. Orthop.* **90**, 236-245, 1973.
- 7) Gately, C.L., Muul, L.M., Greenwood, M.A., Papazoglou, S., Dick, S.J., Kornblith, P.L., Smith, B.H. and Gately, M.K.: In vitro studies on the cell-mediated immune response to human brain tumors. II. Leukocyte-induced coats of glycosaminoglycan increase the resistance of glioma cells to cellular immune attack. *J. Immunol.* **133**, 3387-3395, 1984.
- 8) Hascall, V.C. and Heinegård, D.: Aggregation of cartilage proteoglycans. I. The role of hyaluronic acid. *J. Biol. Chem.* **249**, 4232-4241, 1974.
- 9) Hascall, V.C. and Heinegård, D.: Aggregation of cartilage proteoglycans. II. Oligosaccharide competitors of the proteoglycan hyaluronic acid interaction. *J. Biol. Chem.* **249**, 4242-4249, 1974.
- 10) Christner, J.E., Brown, M.L. and Dziewiatkowski, D.D.: Interactions of cartilage proteoglycans with hyaluronate. Inhibition of the interaction by modified oligomers of hyaluronate. *J. Biol. Chem.* **254**, 4624-4630, 1979.
- 11) Dahl, L.B., Dahl, I.M., Laurent, E.A. and Granath, K.: Concentration and molecular weight of sodium hyaluronate in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and other arthropathies. *Ann. Rheum. Dis.* **44**, 817-822, 1985.
- 12) 近藤 仁: 正常および病的ヒト関節液の粘性に関する研究. 北里医学 **10**, 485-498, 1980.
- 13) Iwata, H.: Pharmacologic and clinical aspects of intraarticular injection of hyaluronate. *Clin. Orthop.* **289**, 285-291, 1993.
- 14) Gotoh, S., Onaya, J., Abe, M., Miyazaki, K., Hamai, A., Horie, K. and Tokuyasu, K.: Effects of the molecular weight of hyaluronic acid and its action mechanisms on experimental joint pain in rats. *Ann. Rheum. Dis.* **52**, 817-822, 1993.
- 15) Tamoto, K., Nochi, H., Tada, M., Shimada, S., Mori, Y., Kataoka, S., Suzuki, Y. and Nakamura, T.: High-molecular weight hyaluronic acid inhibit chemotaxis and phagocytosis but not lysosomal enzyme release induced by receptor-mediated stimulations in guinea pig phagocytes. *Microbiol. Immunol.* **13**, 161-166, 1993.
- 16) Sakakibara, Y., Miura, T., Iwata, H., Kikuchi, T., Yamaguchi, T., Yoshimi, T. and Itoh, H.: Effect of high-molecular-weight sodium hyaluronate on immobilized rabbit knee. *Clin. Orthop.* **299**, 282-292, 1994.
- 17) Yoshimi, T., Kikuchi, T., Obara, T., Yamaguchi, T., Sakakibara, Y., Itoh, H., Iwata, H. and Miura, T.: Effects of high-molecular-weight sodium hyaluronate on experimental osteoarthritis induced by the resection of rabbit anterior cruciate ligament. *Clin. Orthop.* **298**, 296-304, 1994.
- 18) Schiavinato, A., Lini, E., Guidolin, D., Pezzoli, G., Botti, P., Martelli, M., Cortivo, R., De Galateo, A. and Abatangelo, G.: Intraarticular sodium hyaluronate injections in the Pond-Nuki experimental model of osteoarthritis in dogs. II. Morphological findings. *Clin. Orthop. Rel.* **241**, 286-299, 1989.
- 19) Forrester, J.V. and Balazs, E.A.: Inhibition of phagocytosis by high molecular weight hyaluronate. *Immunology* **40**, 435-446, 1980.
- 20) Yasui, T., Akatsuka, M., Tobetto, K., Hayaishi, M. and Ando, T.: The effect of hyaluronan on interleukin-1 alpha-induced prostaglandin E2 production in human osteoarthritic synovial cells. *Agents Actions Suppl.* **37**, 155-156, 1992.
- 21) 岡 正典, 中村孝志, 木次敏明: 高分子ヒアルロン酸の関節潤滑機構に及ぼす効果. 日関外誌 **12**, 259-266, 1993.
- 22) Culty, M., Miyake, K., Kincade, P.W., Sikorski, E., Butcher, E.C., Underhill, C. and Sikorski, E.: The hyaluronate receptor is a member of the CD44 (H-CAM) family of cell surface glycoproteins. *J. Cell Biol.* **111**, 2765-2774, 1990.
- 23) Samuel, S.K., Hurta, R.A., Spearman, M.A., Wright, J.A., Turley, E.A. and Greenberg, A.H.: TGF-beta 1 stimulation of cell locomotion utilizes the hyaluronan receptor RHAMM and hyaluronan. *J. Cell Biol.* **123**, 749-758, 1993.
- 24) Knudson, C.B. and Knudson, W.: Hyaluronan-

- binding proteins in development, tissue homeostasis, and disease. *FASEB J.* **7**, 1233-1241, 1993.
- 25) Turley, E.A., Austen, L., Moore, D. and Hoare, K.: Ras-transformed cells express both CD44 and RHAMM hyaluronan receptors: only RHAMM is essential for hyaluronan-promoted locomotion. *Exp. Cell Res.* **207**, 277-282, 1993.
 - 26) West, D.C., Hampson, I.N., Arnold, F. and Kumar, S.: Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. *Science* **228**, 1324-1326, 1985.
 - 27) Shimazu, A., Jikko, A., Iwamoto, M., Koike, T., Yan, W., Okada, Y., Shinmei, M., Naka-mura, S. and Kato, Y.: Effects of hyaluronic acid on the release of proteoglycan from the cell matrix in rabbit chondrocyte cultures in the presence and absence of cytokines. *Arthritis Rheum.* **36**, 247-253, 1993.
 - 28) Weight, T., Heinegård, D., Hascall, V.C.: Cell Biology of Extracellular Matrix (Hay, E.D., editor). Plenum Press, New York, 45-78, 1991.
 - 29) Laterra, J. and Culp, L.A.: Differences in hyaluronate binding to plasma and cell surface fibronectins. Requirement for aggregation. *J. Biol. Chem.* **257**, 719-726, 1982.
 - 30) Hardingham, T.E., Muir, H., Kwan, M.K., Lai, W.M. and Mow, V.C.: Viscoelastic properties of proteoglycan solutions with varying proportions present as aggregates. *J. Orthop. Res.* **5**, 36-46, 1987.
 - 31) Mow, V.C., Mak, A.F., Lai, W.M., Rosenberg, L.C. and Tang, L.H.: Viscoelastic properties of proteoglycan subunits and aggregates in varying solution concentrations. *J. Biomech.* **17**, 325-338, 1984.
 - 32) Holmes, M.W., Bayliss, M.T. and Muir, H.: Hyaluronic acid in human articular cartilage. Age-related changes in content and size. *Biochem. J.* **250**, 435-441, 1988.
 - 33) Turley, E.A. and Roth, S.: Interactions between the carbohydrate chains of hyaluronate and chondroitin sulphate. *Nature* **283**, 268-271, 1980.
 - 34) Ogston, A.G. and Stanier, J.E.: The physiological function of hyaluronic acid in synovial fluid; viscous, elastic and lubricant properties. *J. Physiol.* **119**, 244-252, 1953.
 - 35) Kobayashi, S., Yonekubo, S. and Kurogouchi, Y.: Cryoscanning electron microscopic study of the surface amorphous layer of articular cartilage. *J. Anat.* **187**, 429-444, 1995.
 - 36) 小林千益, 松坂 聡, 宮内 聡, 米久保 荘, 黒河内靖子: 関節軟骨の最表層の生化学的研究. 日整外誌 **69**, 1323, 1995.
 - 37) Mabuchi, K., Tsukamoto, Y., Obara, T. and Yamaguchi, T.: The effect of additive hyaluronic acid on animal joints with experimentally reduced lubricating ability. *J. Biomed. Mater. Res.* **28**, 865-870, 1994.
 - 38) Collier, S. and Ghosh, P.: Effects of transforming growth factor beta on proteoglycan synthesis by cell and explant cultures derived from the knee joint meniscus. *Osteoarthritis Cartilage* **3**, 127-138, 1995.
 - 39) Welsh, E.J., Rees, D.A., Morris, E.R. and Madden, J.K.: Competitive inhibition evidence for specific intermolecular interactions in hyaluronate solutions. *J. Mol. Biol.* **138**, 375-382, 1980.
 - 40) Morris, E.R., Rees, D.A. and Welsh, E.J.: Conformation and dynamic interactions in hyaluronate solutions. *J. Mol. Biol.* **138**, 383-400, 1980.
 - 41) Mikelsaar, R.H. and Scott, J.E.: Molecular modeling of secondary and tertiary structures of hyaluronan, compared with electron microscopy and NMR data. Possible sheets and tubular structures in aqueous solution. *Glycoconj. J.* **11**, 65-71, 1994.
 - 42) Miller, D. and Stegmann, R.: The use of Healon in intraocular lens implantation. *Int. Ophthalmol. Clin.* **22**, 177-187, 1982.
 - 43) Bernatchez, S.F., Merkli, A., Tabatabay, C., Gurny, R., Zhao, Q.H., Anderson, J.M. and Heller, J.: Biotolerance of a semisolid hydrophobic biodegradable poly (ortho ester) for controlled drug delivery. *J. Biomed. Mater. Res.* **27**, 677-681, 1993.
 - 44) Weber, G.F., Ashkar, S., Glimcher, M.J. and Cantor, H.: Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science* **271**, 509-512, 1996.
 - 45) Bartolazzi, A., Nocks, A., Aruffo, A., Spring, F. and Stamenkovic, I.: Glycosylation of CD44 is implicated in CD44-mediated cell adhesion to hyaluronan. *J. Cell. Biol.* **132**, 1199-1208, 1996.