

〔原著〕 軟骨破壊初期段階における好中球の関与

山 越 弘 明*

(平成4年12月14日受付, 平成5年5月26日受理)

要 旨

慢性関節リウマチ (RA) の患者関節液中に多数存在する多形核白血球 (PMN) は, 関節軟骨マトリックス分解酵素を放出し, 軟骨破壊に関与するものと考えられている。PMN ゼラチナーゼのコラーゲンに対する作用を生化学的に検討するとともに, 軟骨破壊の過程での PMN の関与を *in vivo* で観察する目的で, コラーゲン関節炎発症カニクイザルの種々の破壊像を呈した関節を用いて病理組織学的および免疫組織化学的に検討した。病理組織学的には, 滑膜細胞の増生, 炎症細胞の浸潤, さらに軟骨表面には浸潤している細胞に分葉核を呈する PMN の存在が認められた。プロテオグリカン喪失の指標として用いたサフラニン O の染色性の喪失が軟骨表層で一部観察される破壊初期の段階では, プロテオグリカンの喪失に対応して PMN ゼラチナーゼの浸潤が認められた。一方, 軟骨破壊の進行した段階では, 線維芽細胞ゼラチナーゼが軟骨内部の軟骨細胞に発現されていた。代表的な炎症因子である IL-1 は, 破壊の進行とともに軟骨内部の軟骨細胞において IL-1 の発現がみられた。軟骨破壊の進行過程では, PMN ゼラチナーゼ等 PMN 由来酵素が関節軟骨表層から浸潤し軟骨マトリックスを分解する。これにより IL-1 などのサイトカインが容易に内部に侵入し軟骨細胞を刺激し, 刺激された軟骨細胞は自らも軟骨マトリックス分解酵素を産生し内部からも破壊が進行するものと推測され, PMN が軟骨破壊初期段階で大きく関与すると考えられた。また, 一方では, PMN ゼラチナーゼは *in vitro* で XI 型コラーゲンを分解することが明らかとなった。

Key words: Cartilage destruction, Polymorphonuclear cell, PMN gelatinase, Collagen-induced arthritis, Type XI collagen

略語一覧: PMN: polymorphonuclear cell, PAP: peroxidase anti-peroxidase.

I. 緒 言

関節軟骨のマトリックスは, 主にコラーゲンおよびプロテオグリカンで構成されており, コラーゲンはその構造の違いから主成分である II 型と, 微量成分である IX, X, XI 型に分類されている¹⁾。これらのマトリックス成分の分解は, 軟骨の構造的特性に変化を与えて, 最終的には, 関節の機能障害を招く。

正常関節液中の白血球数は 1 立方 mm あたり 200 以下であるのに対し, 慢性関節リウマチ患者の関節液中には, 5,000 から 75,000 の白血球が含まれており, その 50

% 以上が多形核白血球 (以下 PMN) という特徴を呈している。さらに PMN は, マトリックス分解酵素としてコラゲナーゼ, エラスターゼ, ゼラチナーゼを放出するが, コラゲナーゼは II 型コラーゲン, エラスターゼはプロテオグリカンを分解し軟骨破壊に関与することが諸家により報告されている²⁻⁴⁾。しかしながら, ゼラチナーゼはコラーゲン変性物のゼラチンを分解する⁵⁾ がその軟骨破壊での働きについては不明である。さらに, 軟骨破壊の過程で PMN 由来のこれらの酵素がどのように作用しているかの詳細については不明のため, 著者は PMN ゼラチナーゼの軟骨マトリックスへの作用を生化学的に

* 千葉大学医学部整形外科科学講座

* Hiroaki YAMAKOSHI: Active Involvement of PMNs in Early Cartilage Destruction. Department of Orthopaedic Surgery, School of Medicine, Chiba University, Chiba 260
Received December 14, 1992 Accepted May 26, 1993.

検討するとともに、免疫組織化学的手法を用い関節軟骨破壊進行過程における PMN ゼラチナーゼの動態を明らかにすることを目的とし、

- I. 実験1: PMN ゼラチナーゼの軟骨型コラーゲン分解能の生化学的検討,
実験2: ヒト正常軟骨のXI型コラーゲンの局在の免疫組織化学的検討,
- II. 実験3: コラーゲン関節炎発症カニクイザルを用いた病理学的, 免疫組織化学的検討,
以上の3つの実験を行い検討した。

II. 実験材料および方法

1. 材料

実験1: ウシII型コラーゲン, ブタXI型コラーゲン, ヒト PMN ゼラチナーゼは, 東京医科歯科大学難治疾患研究所異常代謝部門, 永井 裕教授より恵与された。実験2: 60代女性2名, 70代男性1名の大腿骨頸部内側骨折にたいする人工骨頭置換術時に摘出された骨頭部分の軟骨を用いた。

実験3: 年齢3-5才のカニクイザルの雌5頭, 雄1頭を用いた。体重は雌2-3kg, 雄3kgであった。

2. 方法

実験2: IIまたは, XI型コラーゲン8 μ gとPMN ゼラチナーゼ36ngとを0.05M Tris-HCl, pH 7.5, 0.15M NaCl, 5mM CaCl₂, 15 μ l中で37°Cにて2時間, 4時間, 8時間と反応させた。反応させた後, 80mM 0-フェナントロリン1 μ gを添加して反応を止め, 各々の反応液をLaemmliの方法⁵⁾に従ってSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE, 7.5%)に供し, バンドのパターンを検討した。

実験2: 摘出したヒト軟骨を10%中性緩衝ホルマリンにて48時間固定し, パラフィン包埋ののち, 連続薄切切片を作成し, 東京農工大学硬蛋白質利用研究所新井克彦助手より共与された抗XI型コラーゲン抗体⁶⁾を用いPAP法(Peroxidase anti-peroxidase method)^{6,7)}にて免疫組織化学染色を行った。すなわち, 組織切片を脱パラフィンし, 0.05%プロテアーゼ(type IIIIV Sigma)溶液にて15分室温にて処理し50mM Tris 緩衝液で洗浄後, 0.5%過ヨウ素酸にて15分処理し内因性ペロキシダーゼ活性を阻止した。洗浄後, 5%正常ウサギ血清を10分間作用させ非特異反応を抑制後, 抗XI型コラーゲン抗体を4°Cにて一晚反応させた。洗浄後, 2次抗体を60分, 37°Cにて反応させ, さらに, PAP complex (DAKO)を60分, 37°Cにて処理し, 洗浄後DAB溶液にて発色させた。陰性対照として, 抗XI型コラーゲン抗体の代わ

りに正常ウサギ IgG を反応させた。

実験3: 1) 関節炎の惹起: ニワトリの肋軟骨由来ペプシン可溶性II型コラーゲン(DEAE-セルロースカラム処理によりプロテオグリカンを除去した精製標品) 2mg/mlとなるように, 0.05Mの酢酸に溶解後, 等量の完全フロイトアジュバンドとエマルジョンにして, その1mlをカニクイザルの背部皮内に約20カ所に分け注射した。

2) 関節炎を呈したカニクイザルを, 屠殺後, 股関節7, 膝関節12, 肩関節4, 肘関節7, 中手指節関節51, 指骨間関節101, 中足趾節関節50, 趾骨間関節98と合計330関節を摘出し, 摘出標本を10%中性緩衝ホルマリン固定後, 0.15M EDTA/0.05M Tris-HCl, pH 7.5により脱灰, 正中矢状断にてパラフィン包埋した後, 厚さ4 μ mの連続薄切切片を作成, ヘマトキシリン-エオジン染色, プロテオグリカン喪失の指標としてサフラニンO染色^{8,9)}を行った。また, PMN ゼラチナーゼに対する単クローン抗体¹⁰⁾, さらに市販のIL-1(大塚製薬)に対するポリクローン抗体を用いて, PAP法にて免疫組織化学的染色を行った。PMN ゼラチナーゼに対する抗体は4クローン(4C6, 4G6, 4H4, 1G5)存在するが, 4C6はPMN由来92kDゼラチナーゼのみを認識するのに対し, 4G6は92kDゼラチナーゼ, 線維芽細胞由来72kDゼラチナーゼの両者を認識するため軟骨細胞産生酵素の指標として用いた。陰性対照として, それぞれの抗体の代わりに正常マウスIgGおよび正常ウサギIgGを反応させた。

III. 結 果

実験1: Fig. 1のレーン1はXI型コラーゲンのみ, レーン2から4は, それぞれXI型コラーゲンとPMN ゼラチナーゼを2時間, 4時間, 8時間反応させた電気泳動像, レーン5は, XI型コラーゲンをPMN ゼラチナーゼを加えずに8時間放置した後の電気泳動像, レーン6はII型コラーゲンの電気泳動像, レーン7はII型コラーゲンとPMN ゼラチナーゼを8時間反応させた電気泳動像である(Fig. 1)。レーン1に示すごとく, XI型コラーゲンは1 α , 2 α , 3 α 鎖の3つの α 鎖から構成されているが, 反応させた時間とともに1 α , 2 α 鎖が徐々に消失しPMN ゼラチナーゼはXI型コラーゲンをよく分解することが判明した。一方, 同条件下ではII型コラーゲンの α 鎖は消失せず, PMN ゼラチナーゼではII型コラーゲンは分解されなかった。

実験2: 抗XI型コラーゲン抗体を用いての免疫染色像では軟骨細胞のカプセルにXI型コラーゲンの局在が認めら

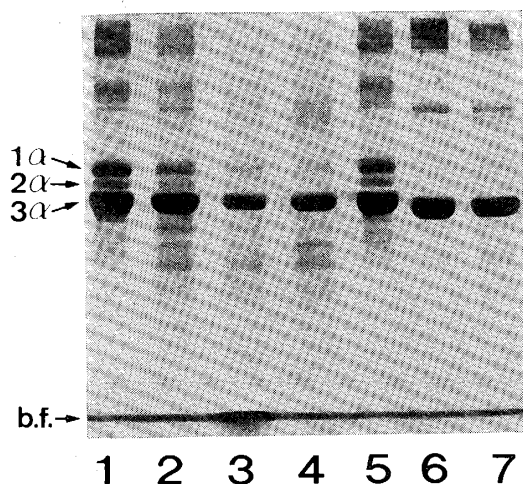


Fig. 1 The time course patterns of type XI and II collagen incubated with PMN gelatinase. Lane 1 stands for type XI collagen alone and lanes 2 to 4 are after 2, 4, and 8 hr incubation with the enzyme. Lane 5 is 8 hr incubation without the enzyme. lanes 6 and 7 are type II collagen incubated with the enzyme for 0 hr and 8 hr as control.

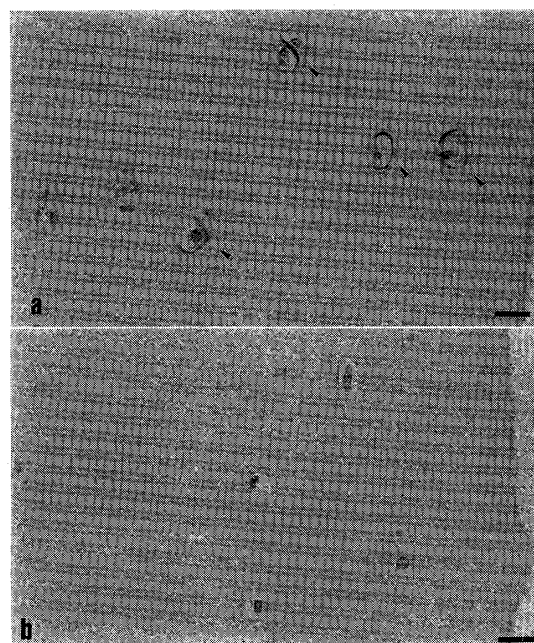


Fig. 2 Immunoperoxidase staining for type XI collagen at human normal articular cartilage. Stained with anti-type XI collagen antibody (a) and with non-immune rabbit IgG as a control (b). Bars: (a), (b) 20 μ m

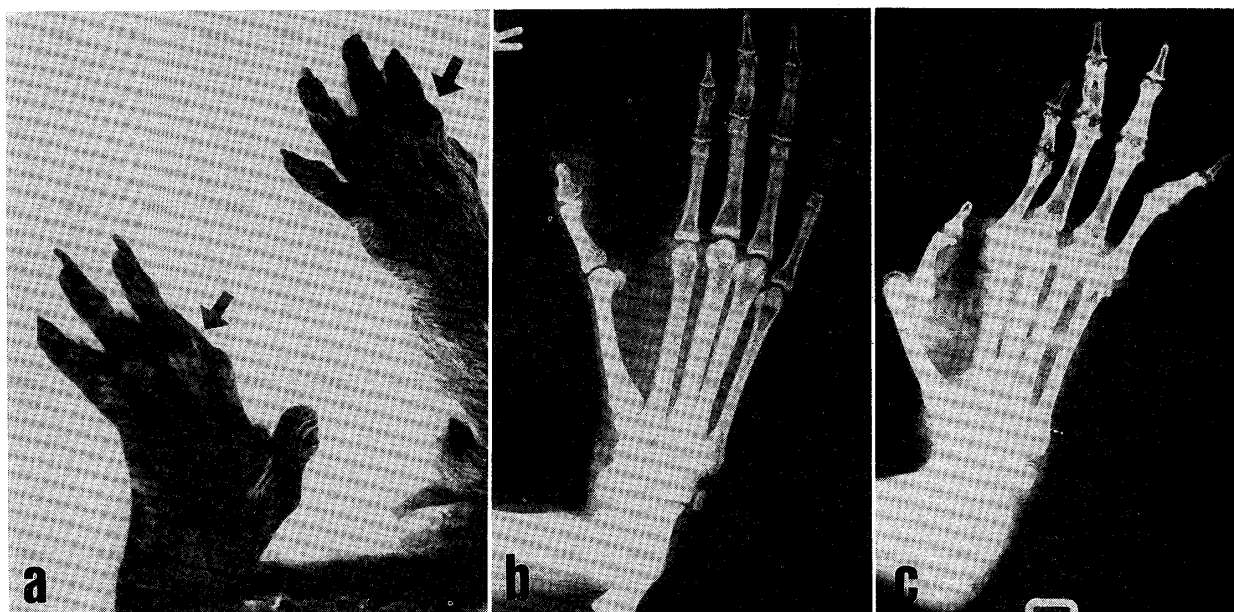


Fig. 3 Radiographs of the right hindfoot of monkey taken before immunization (b) and photograph and radiograph of the same region of the same monkey taken 9 month after immunization (a, c)

れる (Fig. 2a)。

実験3: II型コラーゲン免疫後, 9カ月後の雌のカニクイザルの後肢である (Fig. 3a, c)。単純X線像では, 2から5趾の PIP 関節には, 関節裂隙の狭少化, および骨融解像, 第1趾の MP 関節には脱臼像が認められ, 著明な破壊が多関節にわたって存在していた (Fig. 3c)。

病理学的には, 滑膜細胞の増生が認められず, 明らかな関節破壊像が存在せず, 破壊前の段階と思われる関節から (Fig. 4a), 滑膜細胞の増生, 炎症細胞の浸潤, さらに軟骨に細胞が浸潤し tide mark まで露出した, 破壊の進行した関節 (Fig. 4b) まで種々の段階の破壊像が観察可能であり, 何らかの所見の認められたのは330関

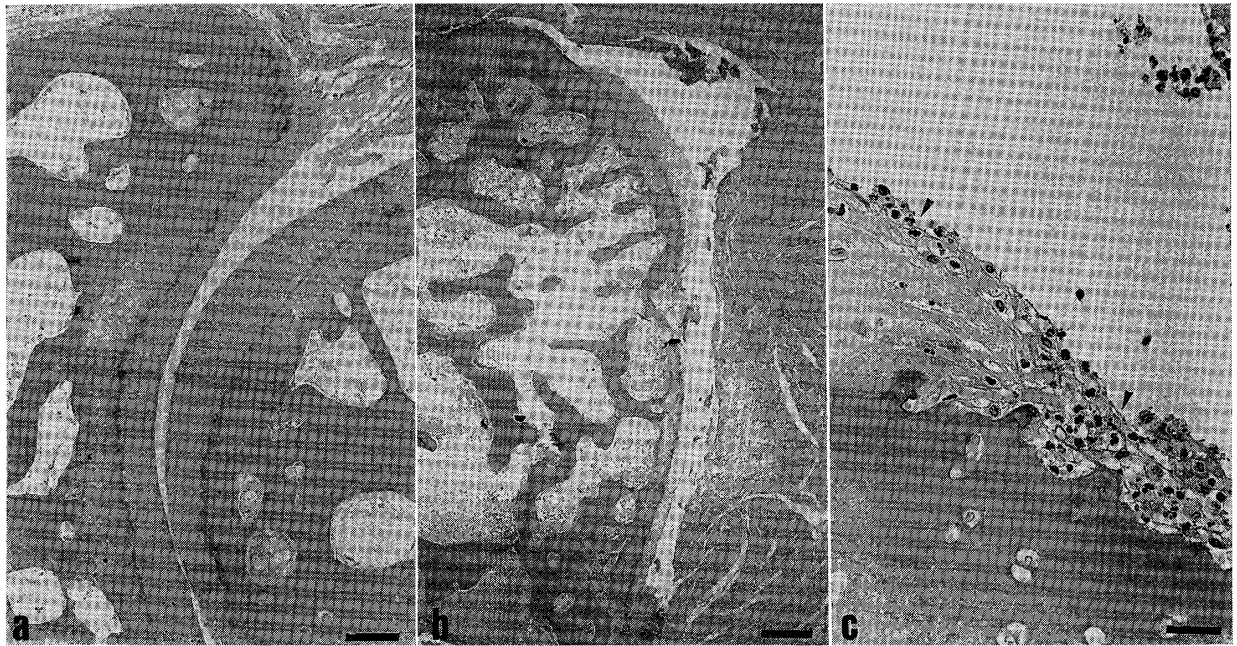


Fig. 4 Haematoxylin-eosin stained sections taken from monkey, 6 weeks after immunization. PIP joint (a) MP joint (b). Intense infiltration of PMNs (arrowhead) to the cartilage was seen. (c) Bars: (a), (b) 200 μ m (c) 50 μ m

節のうち256関節(約78%)であった。強拡大では、軟骨表層より浸潤する細胞の中に分葉核を呈するPMNが存在していた(Fig. 4c)。

同一関節の連続切片を、プロテオグリカン喪失の指標として用いたサフラニンO染色、抗PMNゼラチナーゼ抗体を用いて免疫染色したものでは(Fig. 5)、軟骨表層にプロテオグリカンの喪失がごく一部観察される破壊初期の段階では、プロテオグリカンの喪失に対応してPMNゼラチナーゼの浸潤が認められる(Fig. 5a, b)。しかしながら、軟骨破壊が進行した段階では、プロテオグリカンの喪失が軟骨内部にまで及んでいるのにもかかわらず、PMNゼラチナーゼは、軟骨表層にとどまっていた(Fig. 5c, d Fig. 6a)。陰性対照として用いた正常マウスIgGではまったく反応しなかった(Fig. 6b)。

次に破壊の進行した関節でのPMNゼラチナーゼ、および線維芽細胞ゼラチナーゼの動態は連続切片で観察すると(Fig. 7)、PMNゼラチナーゼが軟骨表層にとどまっていたのに対し(Fig. 7a, b)、線維芽細胞ゼラチナーゼは、軟骨内部の軟骨細胞に発現が認められた(Fig. 7c, d)。線維芽細胞ゼラチナーゼの発現を破壊初期の軟骨で観察すると、軟骨内部の細胞は抗線維芽細胞ゼラチナーゼ抗体には反応しなかった(Fig. 8)。

つづいて、代表的サイトカインであるIL-1の動態についても検討を加えたところ(Fig. 9)線維芽細胞ゼラチナーゼが軟骨内部の細胞に発現している破壊の進行した段階における抗IL-1抗体の染色像(Fig. 9a)では、

IL-1が軟骨表層に浸潤しており、軟骨内部の軟骨細胞にもIL-1の発現が確認された。

IV. 考 察

軟骨マトリックスの構成成分を分解する酵素の中で中性プロテアーゼは種々存在するが、ゼラチナーゼは変性コラーゲンを分解する酵素として命名され、線維芽細胞、好中球など様々な細胞から放出されることが報告されている¹¹⁻¹⁴。PMNゼラチナーゼは、金属依存性蛋白分解酵素であるmatrix metalloproteinase (MMP)に属しMMP-9に分類され、9.2万の分子量の大きさを持ち、変性コラーゲンの他に、基底膜に特有なIV型コラーゲンを分解される可能性が示されている^{13,15}。今回の実験により軟骨マトリックスの構成成分であるXI型コラーゲンを分解する酵素であることが判明し、軟骨破壊に関し何らかの役割を担う可能性が示唆された。

XI型コラーゲンは関節軟骨に存在するコラーゲンの約5%を占めるマイナーコラーゲンであるが、ヒト関節軟骨においては、軟骨細胞のカプセルにXI型コラーゲンの局在が認められた(Fig. 2a)。XI型コラーゲンは、1979年、Burgesonにより、1 α 、2 α 、3 α コラーゲンとしてヒトおよび牛の軟骨に存在するコラーゲンとして報告された¹⁶。その局在については、諸家により報告されている^{17,18}。ヒト成人関節軟骨においては不明であったが、今回の実験よりXI型コラーゲンが軟骨細胞周囲に存在していた。軟骨細胞周囲のマトリックスは、細胞周囲マト

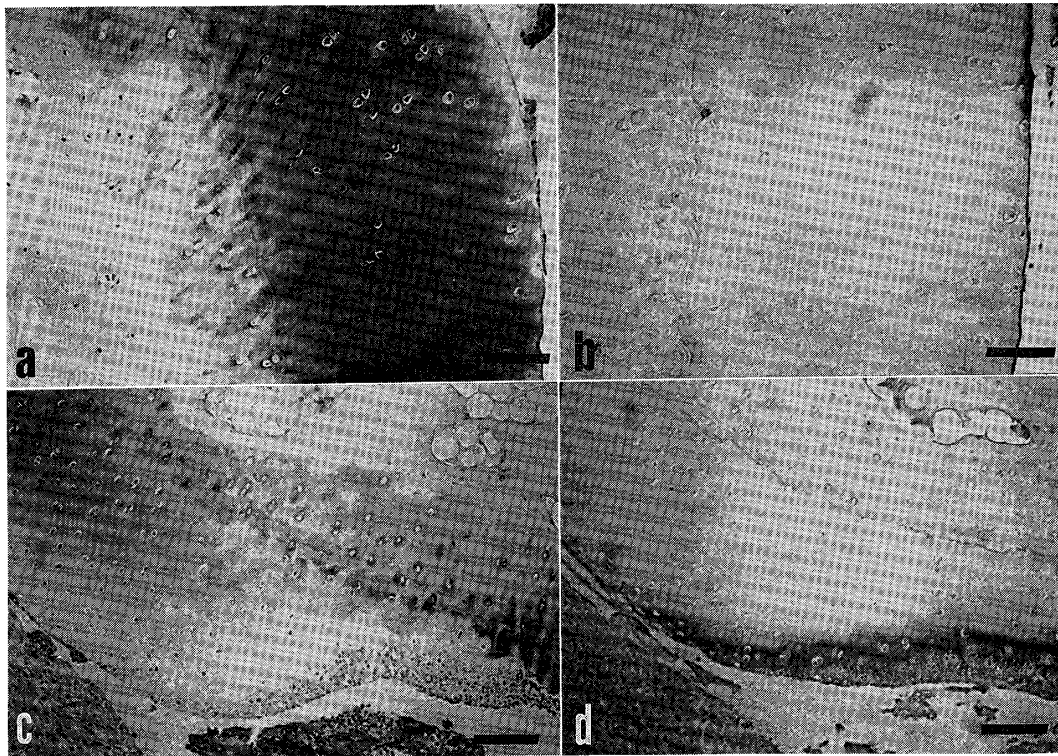


Fig. 5 Safranin-O staining (a, c) and immunostaining with anti-PMN gelatinase antibody (4C6) (b, d). Slight depletion of proteoglycan was observed only at the superficial layer of cartilage (a, b). With progressing cartilage degradation, further invasion of PMN gelatinase was observed (d). Bars: (a), (b) 100 μ m (c, d) 150 μ m

リックス (pericellular matrix), 細胞周囲被膜 (pericellular capsule), 細胞領域マトリックス (territorial matrix), 細胞領域間マトリックス (interterritorial matrix) に区分されている¹⁷⁾ が, XI型コラーゲンは軟骨細胞周囲に存在し, 軟骨細胞周囲は他の軟骨マトリックスとは異なる構造をとっていると思われる。

一方, 軟骨細胞は, その周辺にVI型, IX型コラーゲンを産生, 蓄積して chondron と呼ばれる territory を形成していることが, 報告されているが^{19,20)}, 今回の結果から, XI型コラーゲンも chondron と呼ばれる territory の構成要素のひとつを形成しているものと思われる。

また, ヒト変形性関節症の軟骨抽出物中には正常軟骨由来のそれに比してXI型コラーゲンを分解する酵素活性が高いと報告されている²¹⁾。実験1で示したように, PMNゼラチナーゼがXI型コラーゲンをよく分解することから, 軟骨破壊においてPMNゼラチナーゼも何らかの役割を担っていると考えられる。

ヒト手術時摘出標本を用いた研究では関節破壊の初期から進行段階まで検討することが困難であるため, 実験3としてコラーゲン関節炎発症カニクイザルの病理学的, 免疫組織化学的検討を行った。コラーゲン関節炎は, 多発性関節炎の実験モデルとして, 1977年, Trentham

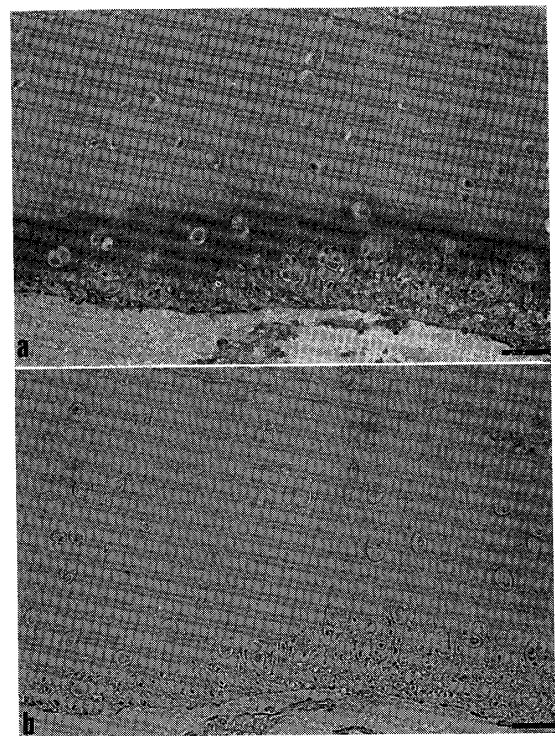


Fig. 6 Immunostainings with antibody to PMN gelatinase (4C6) (a) and with non-immune mouse IgG as a control. (b). Bars: (a, b) 50 μ m

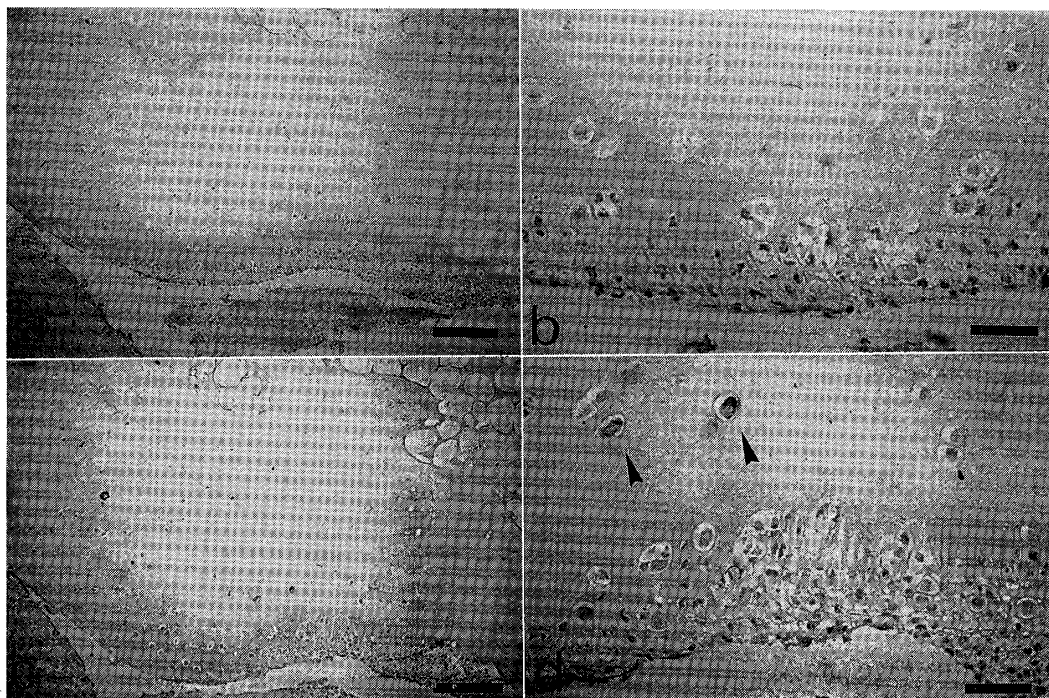


Fig. 7 Immunostaining with anti-PMN gelatinase antibody (4G6) (a, b) and with anti-fibroblast gelatinase antibody (4G6) (c, d). Some chondrocytes (arrowhead) in the inner region were turned on to produce fibroblast gelatinase (c, d)
Bars: (a), (c) 150 μ m (b, d) 50 μ m

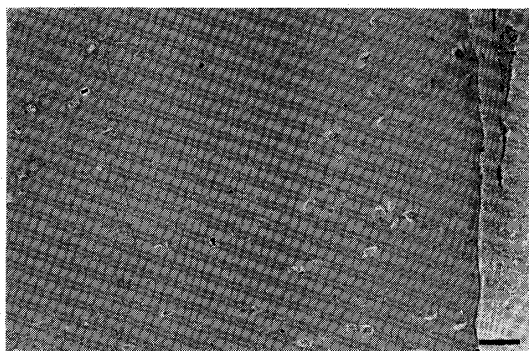


Fig. 8 Immunostaining with anti-fibroblast gelatinase antibody (4G6), at an early stage of inflammation as observed by slight depletion of proteoglycan only at the superficial layer of cartilage. Any chondrocyte was not stained.
Bar: 50 μ m

によりラットを用いての報告²²⁾以来、諸家により多くの報告²³⁻²⁵⁾がある。今回の病理学的検討では、同一個体でもその組織像は多彩であり、滑膜細胞の増生、肥厚が生じて、好中球を主体とする白血球の浸潤が、軟骨表面、および骨、滑膜接合部周辺に認められるのが、特徴的であった。好中球主体という点では諸家の報告と一致しており種差はないものと思われた。RAの組織所見と比較するとリンパ球浸潤という点では異なるものであるが、

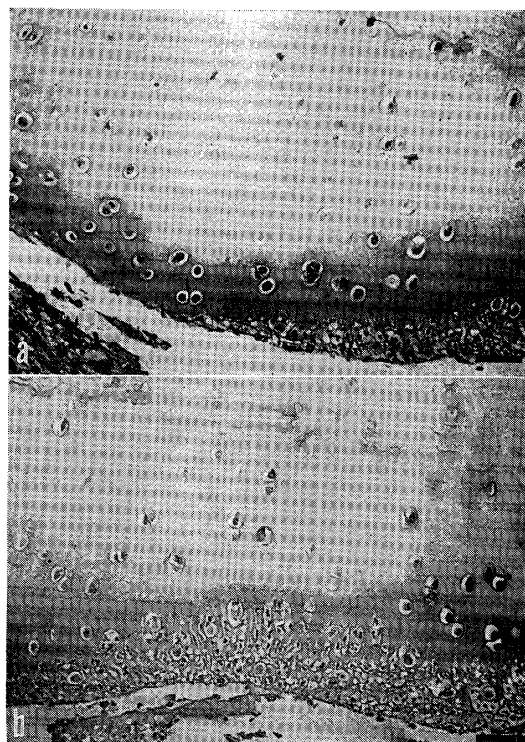


Fig. 9 Immunostaining with anti IL-1 antibody (a) and with antibody to gelatinase (4G6) (b). IL-1 was infiltrating into the surface layer of cartilage. Note that some chondrocytes in the inner produced IL-1 as well as cells in the surface layer (a)
Bars: (a), (b) 50 μ m

軟骨破壊の程度に応じて PMN の関与を知る上では有用なモデルと考えられた。

in vivo において PMN ゼラチナーゼが軟骨破壊の過程で関与するという報告はない。今回用いたモデルでは、PMN ゼラチナーゼが軟骨破壊の過程で変性コラーゲンおよびXI型コラーゲンを分解しているものと思われた。一方、Ollivierre²⁶⁾ は1986年、軟骨破壊の過程での軟骨細胞による autocrine system の存在する可能性を報告したが、PMN ゼラチナーゼを PMN 由来の酵素の指標ととらえると、軟骨細胞自ら分解酵素を産生し軟骨内部からの破壊が起こる軟骨破壊初期の段階で PMN が大きく関与する可能性が極めて大きいと思われた。

今回の実験結果に基づき、PMN ゼラチナーゼおよびその関連因子は軟骨破壊に際し、軟骨破壊初期の段階では、まず、PMN ゼラチナーゼなどの PMN 由来酵素が軟骨表層から浸潤し軟骨マトリックスを分解する。これにより IL-1などのサイトカインが容易に内部に侵入軟骨細胞を刺激する。刺激された軟骨細胞は自らも、マトリックス分解酵素を産生し内部からの破壊が進行すると考えられた。

本研究により以下の結論が得られた。

- 1) PMN ゼラチナーゼは in vitro でXI型コラーゲンを分解した。
- 2) ヒト正常軟骨ではXI型コラーゲンは軟骨細胞周囲に存在した。
- 3) コラーゲン関節炎発症カニクイザルの関節軟骨破壊の過程では軟骨内部におけるマトリックス分解酵素の発現に先立って PMN ゼラチナーゼの軟骨表層からの浸潤が認められた。
- 4) 関節破壊初期段階において PMN が大きく関与することが明らかとなった。

謝辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました守屋秀繁教授に深甚なる謝意を表します。本研究について終始御指導を賜りました東京医科歯科大学難治疾患研究所、永井 裕教授に心より感謝いたします。また、形態学的検索について御指導戴きました東京農工大学硬蛋白研、新井克彦博士に深謝いたします。本研究遂行に際して御助言御協力を戴きました本教室ならびに東京医科歯科大学難治疾患研究所の教室員各位に厚く御礼申し上げます。なお本論文は学位審査論文である。

SUMMARY

To elucidate how and what extent PMNs are involved in cartilage destruction in vivo, histo-

logical and immunohistochemical studies were carried out in joint tissues at various stages of cynomolgus monkeys with type II collagen-induced arthritis. Monoclonal antibodies to PMN gelatinase and fibroblast gelatinase and polyclonal antibody to IL-1 were used.

In the early stage of cartilage destruction, a slight infiltration of PMN gelatinase was observed in the superficial matrix of the articular cartilage, where chondrocytes remained intact. In the advanced stage of cartilage destruction, fibroblast gelatinase and IL-1 were detected inside the chondrocytes in both surface and inner regions.

These results strongly suggest that, in the inflammatory joint diseases, infiltrating PMNs are acting as an initiator of cartilage destruction by releasing proteinases to degrade the superficial layer of the tissues, and thus by giving chances for inflammatory factors to access to chondrocytes to activate.

文 献

- 1) 二宮善文, コラーゲン遺伝子と軟骨分化. 蛋白質・核酸・酵素 31: 53-59, 1986.
- 2) Macartney HW and Tschesche H: Latent and active human polymorphonuclear leukocyte collagenases. Eur J Biochem 130: 71-78, 1983.
- 3) Watanabe H, Hattori S, Katsuda S, Nakaniishi I and Nagai Y: Human neutrophil elastase: Degeneration of basement membrane components and immunolocalization in the tissue. J Biochem 108: 753-759, 1990.
- 4) Wilhelm SM, Collier IE, Marmer BL, Eizen AZ, Grant GA and Goldegr GI: SV-40 transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. J Biol Chem 264: 17213-17221, 1989.
- 5) Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄m. Nature 227: 680-685, 1970.
- 6) Arai K, Uehara K and Nagai Y: Expression of type II and XI collagens in canine mammary mixed tumors and demonstration of collagen production by tumor cells in collagen gel culture. Jpn J Cancer Res 80: 840-847, 1989.
- 7) Sternberger LA, Hardy PL, Cuculis JJ and Meyer HG: The unlabeled antibody-enzyme method of immunohistochemistry preparation and properties of soluble antigen-anti-

- body complex (horse-radish peroxidase anti-horseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* **18** : 315-333, 1970.
- 8) Engfeldt B and Hjertquist SO: The effect of various fixatives on the preservation of acid glycosaminoglycans in tissues. *APMIS* **71** : 269-232, 1967.
 - 9) Rosenberg L: Chemical basis for the histological use of safranino in the study of articular cartilage. *J Bone Joint Surg* **53-A** : 69-82, 1971.
 - 10) Kobayashi T, Hori H, Hattori S, Takagi T, Watanabe H, Nishikawa T and Nagai Y: Characterization of monoclonal antibodies against human PMN gelatinase (type IV collagenase): Abstracts of International Meeting on the Biology and Pathology of the Extracellular Matrix. POS-115, Rorke, 1991.
 - 11) Herrson GS, Banda MJ, Clark EJ, Gavrilovic JG and Werb Z: Secretion of metalloproteinases by stimulated capillary endothelial cells. *J Biol Chem* **261** : 2814-2818, 1986.
 - 12) Seltzer JL, Adams SA, Grant GA and Eizen AZ: Purification and properties of a gelatin-specific neutral protease from human skin. *J Biol Chem* **256** : 4662-4668, 1981.
 - 13) Murphy G, McAlpine CG, Poll CT and Reynolds JJ: Purification and characterization of a bone metalloproteinase that degrades gelatin and type IV and V collagen. *Biochem Biophys Acta* **831** : 49-58, 1985.
 - 14) Williams HR and Lin TY: Human polymorphonuclear leukocyte collagenase and gelatinase. *Int J Biochem* **16** : 1321-1329, 1984.
 - 15) Collier IE, Wilhelm SM, Eisen AZ, Marmer BL, Grant GA, Seltzer JL, Kronberger A, He C, Bauer EA and Goldberg GI: H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen *J Biol Chem* **263** : 6579-6587 1988.
 - 16) Burgeson RE and Hollister DW: Collagen heterogeneity in human cartilage: identification of several new collagen chains. *Biochem Biophys Res Commun* **87** : 1124-1131, 1979.
 - 17) Evans HB, Ayad S, Abedin MZ, Hopkins S, Morgen K, Walton KW, Weiss JB, Holt PJL: Localization of collagen types and fibronectin in cartilage immunofluorescence. *Ann Rheum Dis* **42** : 575-581, 1983.
 - 18) Ricard-Blum S, Hartmann DJ, Herbage D, Payen-Meyran C and Ville G: Biochemical properties and immunolocalization of minor collagens in foetal calf cartilage. *FEBS Lett* **146** : 343-347, 1982.
 - 19) Poole CA, Wotton SF and Duance VC: Localization of type IX collagen in chondrons isolated from porcine articular cartilage and rat chondrosarcoma. *Histochem J* **20** : 567-574, 1988.
 - 20) Poole CA, Ayad S and Schofield JR: Chondrons from articular cartilage. *J Cell Sci* **90** : 635-643, 1988.
 - 21) Yu LP Jr, Smith GN Jr, Brandt KD and Capello W: Type XI collagen degrading activity in human osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum* **33** : 1626-1633, 1990.
 - 22) Trentham DE, Townes AS and Kang AH: Autoimmunity to type II collagen: an experimental model of arthritis. *J Exp Med* **146** : 857-868, 1977.
 - 23) Stuart JM, Cremer MA, Townes AS and Kang AH: Collagen-induced arthritis in rats. Passive transfer with serum and evidence that IgG antibodies can cause arthritis. *J Exp Med* **155** : 1-16, 1982.
 - 24) Terptio K, Hashida R, Miyamoto K, Morimoto T, Kato Y, Kobayashi S, Tajima T, Otake S, Hori H and Nagai Y: Histological, immunological and biochemical studies on type II collagen-induced arthritis in rats. *Biomed Res* **3** : 495-505, 1982.
 - 25) Yoo TJ, Kim SY, Stuart JM, Floyd RA, Olson GA, Cremer MA and Kang AH: Introduction of arthritis in monkeys by immunization with type II collagen. *J Exp Med* **168** : 777-782, 1988.
 - 26) Ollivierre F, Gubler U, Towle CA, Laurencin C and Treadwell BV: Expression of IL-1 genes in human and bovine chondrocytes: A mechanism for autocrine control of cartilage matrix degradation. *Biochem Biophys Res Commun* **141** : 904-911, 1986.