

慢性関節リウマチの基礎的ならびに臨床的研究

第 一 編

末梢血、関節液および滑膜における酵素学的考察

岡山大学医学部第三内科教室（主任：大藤 真教授）

業 天 洋 三

〔昭和50年6月30日受稿〕

目 次

第1章 緒 言	ソザイム分画
第2章 検査対象	3) Acid Phosphatase (Ac-P) 活性
第3章 酵素活性測定法	4) Alkaline Phosphatase (Al-P) 活性
第4章 成 績	第5章 考 按
1) LDH の総活性とアイソザイム分画	第6章 結 論
2) β -glucuronidase (β -G) の総活性とアイ	

第1章 緒 言

酵素化学の進歩は、各種疾患の診断を容易ならしめ、病因ならびに病態生理の解明に大きな手がかりを与えて来ている。

リウマチ性疾患についても言外ではなく、その関節液に高くみられる乳酸脱水素酵素 (LDH), β -glucuronidase (β -G), acid phosphatase (Ac-P) 等の諸酵素活性に関しても各方面からの追求がなされている。

LDH アイソザイムの草分けは, Neilds¹⁾ (1952) が2分画に, Vesell と Bearn²⁾ (1957) が3分画に分離したことに始まり, その後, Wroblewski³⁾ (1962) のデン粉ゲル泳動法, Wieme⁴⁾ (1959), van der Helm⁵⁾ (1962) の寒天ゲル電気泳動法によって, ヒトの血清中のLDHが5つの分画に分けられることが見出され, 今日のアイソザイムの概念が確立されるに至った。

しかし, LDH およびそのアイソザイムのリウマチ性疾患に対する応用は比較的あたらしい。

Vesell⁶⁾ ら (1962), West⁷⁾ ら (1963), Cohen⁸⁾ (1964), Jasani⁹⁾ ら (1969) および石原¹⁰⁾ (1970) らの研究では, 慢性関節リウマチの関節液にみられるLDHの高活性の原因が, 関節液中に遊出してきた白血球や, 炎症性滑膜からの酵素の流出に由来するものであろうと述べているが, この様な報告も, アイソザイムを測定することによってはじめてなされた成果である。

一方, LDHのみならず, 電気泳動法やカラムクロマトグラフィーの発展によって, 最近脚光をあびて来た分野に β -glucuronidase (β -G) のアイソザイムがある。過去に Mills (1940), Fishman (1947), Moore¹¹⁾ ら (1960) によって β -Gの isozymic patternの存在が想定されたが, 更に発展して近年では肺, 肝, 子宮等の癌および胃癌を中心とする悪性腫瘍や肝硬変症の診断に利用すべく, その組織, 血清, 分泌物および滲出液等についてアイソザイムが測定され, その臨床的, 診断的応用が試みられてきている。^{12) 13) 14)}

しかし, リウマチ疾患の β -G アイソザイムの測

定は殆んど試みられておらず、その血清、関節液ならびに滑膜における isozymic な分析は、LDH のアイソザイムと並行してこそ更に意義深いものと考えられる。

従来の報告では、慢性関節リウマチ患者の関節液中に高活性に認められる LDH, β -G, Ac-P 等の諸酵素は、その由来を炎症性白血球に求めたものが多かったのであるが、著者は、関節リウマチの病態に関する研究の一環として、LDH および β -G のアイソザイムを併せて測定し、Ac-P ならびに alkaline phosphatase (Al-P) の測定も加えてリウマチの酵素活性、とくに関節液中の酵素活性の由来について研究し、検討を加えたので報告する。

(表 1) 酵素活性測定例数

		L total	D H isozyme	B - G		Ac - P	Al - P
				total	isozyme		
R A	血 清	32	11	45	5	39	12
	関 節 液	35	30	30	8	26	18
	滑 膜	6	6	6	6	—	5
O A	血 清	12	3	6	3	6	6
	関 節 液	12	8	17	3	15	10
non-RA	関 節 液	10	3	6	—	—	5
	滑 膜	4	3	5	(1)	—	5
健 常 人 血 清		20	5	12	4	11	10

第 2 章 検 査 対 象

- 1) 岡山大学医学部第三内科リウマチ外来に通院あるいは入院せる American Rheumatism Association の診断基準により診断した慢性関節リウマチ (RA), 変形性関節症 (OA) の患者の血清と関節液
 - 2) 滑膜切除術の際に得た RA の膝滑膜
 - 3) 非リウマチ性疾患 (non-RA) 屍体から死後 6 時間以内に採取した膝関節液と滑膜
 - 4) 対照として教室の医局員より得た血清
 - 5) 健康ヒトおよびイヌ末梢血より分離した白血球
- 上記被検者の測定例数は、RA 45 例, OA 17 例, non-RA 屍体 10 例, 健康人 20 例, ヒトおよびイヌ白血球各 2 例であるが、各種酵素活性の測定例数の細目は表 1 に示す通りである (表 1)。

なお血清は肘静脈より採血后、2000 rpm で 10 分間

遠沈分離し、関節液は膝関節を十分に消毒し、18ゲージの注射針で穿刺して採取したのちヒアルロニダーゼ処置を行ない、いずれも -20°C 下に凍結保存し、1 週間以内に酵素活性を測定した。

滑膜は、滑膜切除術に際し除去された滑膜を約 1 分間流水により水洗して表面の血液成分を洗い流したのち、ほぼ米粒大に細切して 10 倍量の蒸留水を加えてホモジナイズし、その抽出液の上清の酵素活性を測定した。

ヒトおよびイヌ末梢血の白血球については、Dio-guardi¹⁵⁾ らの塩化アンモニウム水溶液を用いる方法によって、20 ml の末梢血から分離した乾燥白血球に 1 ml の蒸留水を加えて振盪溶解した液中の酵素

活性を測定した。

第 3 章 酵素活性測定法

1) LDH 総活性およびアイソザイム分画

LDH 総活性は、Wroblewski 法にもとずき、改良されたヤترون社のキットを用いて測定した。

pyruvic acid + $\text{NADH}_2 \xrightarrow{\text{LDH}}$ lactic acid + NAD すなわち、血清 (被検液) と pyruvic acid を incubate すると、血清中の LDH の作用によって pyruvic acid が一部乳酸に移行する。未反応の基質に呈色試薬ならびに Na OH を加えて発色させ、その吸光度を分光光度計にて 500 m μ の波長を用いて測定し、残存する基質量との相関から LDH 単位を求めた。

LDH のアイソザイム分画は、Wieme⁴⁾ の装置に準じ、Helm⁵⁾ Yakulis¹⁶⁾ の方法を modify した寒天ゲ

(表 2) 染色液の成分 (寒天板 4 枚分)

Sodium lactate (1.0M)	2 ml
β -Diphosphopyridine nucleotide	8 mg (+H ₂ O 2 ml)
Phenazine methosulfate	6 mg (+H ₂ O 6 ml)
Nitro blue tetrazolium	13 mg (+H ₂ O 4 ml)
Sodium cyanide (0.1M)	2 ml
Phosphate buffer (PH6.0, 0.1M)	10 ml
Distilled water	10 ml

ル電気泳動法¹⁷⁾¹⁸⁾によって測定した(0.1 M Veronal Buffer + 1 % special Noble Agar, pH8.6) . すなわち, スライドガラス板上に厚さ 2mm の寒天板 (0.05 M Veronal Buffer を用いた 0.75 % special Noble Agar) を置き, やゝ陽極よりに長さ 8mm, 巾 1mm の Slit を作り, 約 16 μ l の検体を入れ (一枚のスライドガラスで二検体泳動できる), 泳動槽の石油エーテルを約 10℃ に保ち, 20 V/cm で 50 分間泳動した. 終了後直ちに, Yokulis¹⁹⁾ の処方に準じた染色液 (表 2) に浸し, 37℃ の孵卵器で 45 分間 incubate した後, 10 % 酢酸で 10 分間固定し, 24 時間水洗した. 次いで濾紙で被い室温にて乾燥放置した後, 570m μ の filter を使用して densitometry を行ない分画比を求めた. 5 つのアイソザイム分画は, Wieme²⁰⁾ 吉田¹⁹⁾ らにならって, 陽極側すなわち易動度の早いものから, LDH₁, LDH₂ …… LDH₅ とした.

(表 3) 酵素活性測定成績

		LDH (u/ml)	β -G (u/dl/hr)	Ac-P (K. A. -U)	Al-P (B. L. -U)
R A	血清	473 $\pm$ 128.4	1328 $\pm$ 554.0	2.9 $\pm$ 1.4	2.2 $\pm$ 0.8
	関節液	1640 $\pm$ 914.9	2578 $\pm$ 1553.8	13.5 $\pm$ 10.2	1.0 $\pm$ 0.5
	滑膜	11750 $\pm$ 2535.0	※ 464 $\pm$ 104.3	—	—
O A	血清	416 $\pm$ 49.8	1040 $\pm$ 125.3	2.1 $\pm$ 1.4	2.1 $\pm$ 0.6
	関節液	453 $\pm$ 209.1	935 $\pm$ 727.3	2.9 $\pm$ 3.3	1.0 $\pm$ 0.6
non-RA	関節液	413 $\pm$ 157.8	864 $\pm$ 479.8	—	0.7 $\pm$ 0.3
	滑膜	2790 $\pm$ 1109.1	※ 84 $\pm$ 54.4	—	0.2 $\pm$ 0.1
健常人血清		400 $\pm$ 52.7	1309 $\pm$ 276.8	2.7 $\pm$ 0.5	1.6 $\pm$ 0.4

(注) ① 数値は M $\pm$ SD
 ② ※ 臓器単位 (u/g/hr)

2) β -G の総活性およびアイソザイム分画
 β -G の総活性は基質として P-nitrophenyl β -D-glucuronide を用いる塚元氏法に準じて測定した. すなわち, 基質量 3.33g を蒸留水に溶解して全量 100ml に調製 (0.1M) し, この基質溶液 0.1ml を, 0.1M 酢酸・酢酸ソーダ緩衝液 (pH4.0) 0.8ml に加えて 37℃, 10 分間加温したのち, 被検液 0.1ml を添加して再び 37℃, 10 時間保温して反応せしめた. 次いで 0.1N NaOH 1ml を加えて発色させ, 4ml の水で希釈して分光光度計を用い 400m μ の filter を使用して比色定量した. これにより生成された P-nitrophenyl 量の, 反応時間 1 時間, 被検液 100ml 当りの μ g 数をもって酵素活性の単位 (u/dl/hr) とした.

臓器 (組織) の活性値については, あらかじめ pH 4.0 の酢酸・酢酸ソーダ緩衝液を使って 1 w/v % 濃度のホモジネートを作り, その上清を用いて同様の

操作の下に保温時間を7時間として、反応時間1時間、臓器1g当りの μg 数をもって表わした ($\mu\text{g/hr}$) .

一方、 β -Gのアイソザイム分画は、DEAE Sephadex A-50 Column Chromatography によって測定した。すなわち、カラム管の直径を1.5cm、高さ12cmのものを使用し、アイソザイムの溶出には、NaCl濃度をそれぞれ0.05M, 0.10M, 0.15Mおよび1.0Mの割合に含む0.02Mトリス・リン酸緩衝液 (pH8.3) で段階的に溶出した。溶出された β -G活性は先に述べた塚元氏法により比色定量し、その

optic densityが描く面積比をもって表わした。

3) Ac-P 活性

phenylphosphate-2 Na 4-aminoantipyrine Sodium Citrateを基質とする Kind-King 法にもとずき、ヤトロン社のキットを用いて測定した。

すなわち、基質液とクエン酸緩衝液を等量に混合した基質緩衝液に被検液を加えて incubate し、この反応液に呈色試薬を加えて酵素反応を停止させ、同時に遊離したフェノールを発色させて、その吸光度から Ac-P 活性値を求めた (K. A. U) .

4) Al-P 活性

(表4) RAの血清におけるLDH総活性とそのアイソザイム分画 (%)

pt, No.	LDH総活性値	LDH ₁	LDH ₂	LDH ₃	LDH ₄	LDH ₅
1	380	42.7	36.9	9.4	4.5	6.5
2	490	45.3	37.2	7.3	3.9	6.3
3	280	45.3	38.8	8.2	5.4	2.3
4	370	40.1	39.7	6.4	4.5	9.3
5	730	30.4	35.7	18.2	5.1	10.6
6	470	50.9	28.2	9.5	6.5	5.0
7	350	37.6	44.9	6.2	4.8	6.4
8	640	50.7	30.1	10.4	4.2	4.6
9	340	30.0	46.7	8.5	7.0	9.4
10	440	38.2	29.3	15.2	13.1	4.2
11	410	19.5	36.4	18.8	15.7	9.6
12	460					
13	340					
14	300					
15	620					
16	270					
17	640					
18	680					
19	430					
20	420					
21	480					
22	680					
23	430					
24	380					
25	530					
26	720					
27	510					
28	510					
29	570					
30	480					
31	390					
32	390					
	473 ± 128.4	39.2 ± 9.5	36.7 ± 5.9	10.6 ± 4.5	6.8 ± 2.8	6.7 ± 2.7

Sodium-P-nitrophenyl phosphate を基質とする Bessey-Lowry 法に従って測定した。すなわち、被検液中のアルカリ性リン酸酵素が基質に作用して遊離した P-Nitrophenyl 量を比色定量して酵素活性を求めた (B. L. U)。

第4章 成績

今回の研究で得られたリウマチ性疾患の各種酵素

活性の測定値をまとめると表3の如くなる(表3)。以下、個々について詳細を述べる。

1) LDHの総活性とアイソザイム分画

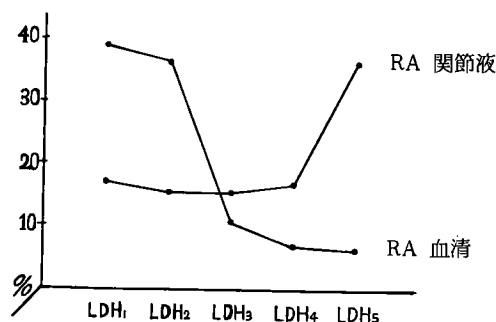
a) RAの血清と関節液について

32例のRA血清のLDH総活性値は平均473 (270~730) u/mlで、うち11例のアイソザイム分画は、LDH₁ 39.2%, LDH₂ 36.7%, LDH₃ 10.6%, LDH₄ 6.8%, LDH₅ 6.7%とLDH₁, LDH₂が高く、LDH₃,

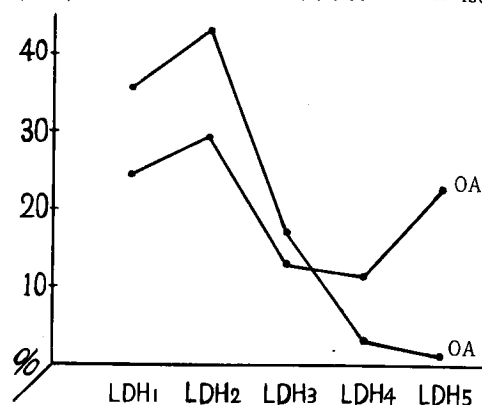
(表5) RAの関節液におけるLDH総活性値とそのアイソザイム分画(%)

pt. No.	LDH総活性値	LDH ₁	LDH ₂	LDH ₃	LDH ₄	LDH ₅
1	1,430	27.1	28.2	18.8	6.5	19.3
2	1,860	18.9	24.4	13.4	13.9	29.4
3	3,580	6.0	15.5	17.5	20.3	40.7
4	3,800	22.2	3.2	0	12.4	62.1
5	1,700	7.4	21.3	32.8	5.9	32.6
6	1,380	25.1	10.4	5.2	17.1	42.2
7	550	26.3	14.6	20.1	19.1	19.9
8	1,360	27.7	31.3	7.7	10.6	22.8
9	910	52.7	11.5	10.4	5.8	19.7
10	1,150	49.3	14.9	5.2	7.6	23.0
11	710	33.3	44.2	0.2	8.5	13.8
12	870	20.7	17.8	8.1	4.2	49.2
13	420	21.0	16.5	15.5	20.4	26.6
14	1,860	9.2	8.8	18.4	12.7	50.9
15	2,000	15.1	20.7	18.7	11.9	33.6
16	1,600	5.0	4.4	26.5	21.2	43.0
17	1,200	16.6	22.4	19.0	7.8	34.2
18	1,150	36.1	18.2	15.4	3.7	26.6
19	1,110	4.3	9.7	10.5	25.1	50.4
20	1,950	11.6	16.4	18.9	16.6	36.5
21	1,130	5.8	6.8	14.0	27.4	46.0
22	1,500	3.6	15.2	12.1	26.0	43.1
23	960	3.7	8.3	15.4	27.2	45.4
24	2,830	7.4	17.2	15.7	22.6	37.1
25	3,780	5.3	10.6	14.2	24.0	45.9
26	1,540	1.7	2.7	14.3	21.3	60.0
27	2,200	9.2	15.0	8.8	23.8	43.2
28	3,400	9.1	16.9	15.1	23.9	35.0
29	1,620	11.9	16.0	23.8	26.7	21.6
30	2,000	16.4	20.5	20.5	26.9	15.7
31	570					
32	830					
33	1,040					
34	870					
35	2,560					
	1,640 ± 914.9	17.0 ± 13.2	16.1 ± 8.6	16.1 ± 7.3	16.7 ± 8.4	35.7 ± 12.9

(図1) RA の血清および関節液のLDH isozyme



(図2) OA の血清および関節液のLDH iso



(表6) OA の血清における LDH 総活性値とそのアイソザイム (%)

pt. No.	LDH 総活性値	LDH ₁	LDH ₂	LDH ₃	LDH ₄	LDH ₅
1	350	40.2	43.5	12.8	2.5	1.0
2	330	35.4	40.9	18.2	3.1	2.4
3	420	32.2	45.0	20.1	2.7	0
4	400					
5	390					
6	460					
7	450					
8	390					
9	500					
10	460					
11	390					
12	450					
	416 ± 49.8	35.9 ± 4.0	43.2 ± 2.1	17.0 ± 3.8	2.8 ± 0.3	1.1 ± 1.2

LDH₄, LDH₅の順に低くなった(表4, 図1)。

35例の RA 関節液の LDH 総活性値は平均, 1640 (420~3800) u/ml で血清に比べて著しい高活性値を示した ($P < 0.001$)。その内, 30例のアイソザイムは, LDH₁ 17.0%, LDH₂ 16.1%, LDH₃ 16.1%, LDH₄ 16.7%, LDH₅ 35.7%で LDH₅の著高 ($P < 0.05$) がみられ, 前述の血清のアイソザイム分画のパターンとは全く逆の分布がみとめられた(表5, 図1)。

b) OA の血清と関節液について

12例の OA 血清の LDH 総活性は平均416 (330~500) u/ml で, うち 3 例のアイソザイムは, LDH₁ 35.9%, LDH₂ 43.2%, LDH₃ 17.0%, LDH₄ 2.8%, LDH₅ 1.1%となり RA の血清とほぼ同様のパターン

であった(表6, 図2)。

同例数の OA 関節液の総活性は, 平均453 (270~900) u/ml で血清の活性値と大差なく, うち 8 例の分画は, LDH₁ 24.3%, LDH₂ 29.2%, LDH₃ 12.5%, LDH₄ 11.5%, LDH₅ 22.5%であった(表7, 図2)。

OA の関節液の LDH₅は血清に比較すれば有意な ($P < 0.001$) 高値であるが, RA の関節液ほど著明な活性上昇はみられなかった。

c) RA の滑膜について

6例の RA 滑膜ホモジネートの血清にみられた LDH 総活性は, 平均11750 (8900~15200) u/ml と著高を示し, その分画は, LDH₁ 1.4%, LDH₂ 3.8%, LDH₃ 17.5%, LDH₄ 38.0%, LDH₅ 39.3%で

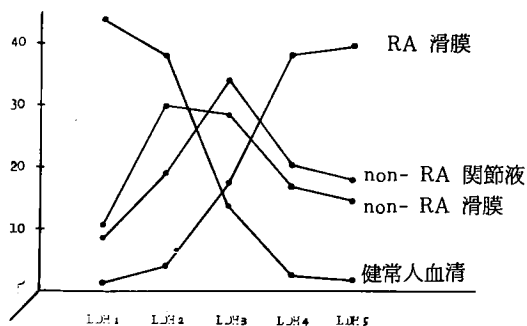
(表 7) OA の関節液における LDH 総活性値とそのアイソザイム (%)

pt. No.	LDH 総活性値	LDH ₁	LDH ₂	LDH ₃	LDH ₄	LDH ₅
1	520	15.8	35.8	10.5	13.7	24.2
2	410	20.0	28.9	3.9	9.7	37.5
3	380	29.4	41.1	7.9	4.1	17.4
4	480	28.6	17.8	17.6	8.3	28.0
5	420	27.4	22.3	16.5	17.2	16.6
6	310	24.1	29.3	13.2	11.0	22.4
7	300	22.4	29.2	12.9	13.8	21.7
8	900	26.6	28.9	17.5	14.4	12.8
9	320					
10	860					
11	270					
12	370					
	453 ± 209.1	24.3 ± 4.7	29.2 ± 7.2	12.5 ± 4.9	11.5 ± 4.1	22.5 ± 3.7

(表 8) RA の滑膜における LDH 総活性値とそのアイソザイム (%)

pt. No.	LDH 総活性値	LDH ₁	LDH ₂	LDH ₃	LDH ₄	LDH ₅
1	12400	2.0	4.0	21.0	48.0	25.0
2	15200	2.4	2.4	20.0	40.0	35.2
3	13600	0	2.8	16.5	39.4	41.3
4	11500	0.9	3.5	18.3	31.3	44.0
5	9100	1.0	3.8	13.5	35.6	46.1
6	8700	2.1	6.3	15.8	32.6	43.2
	11750 ± 2535	1.4 ± 0.9	3.8 ± 1.4	17.5 ± 2.8	38.0 ± 6.1	39.3 ± 7.9

(図 3) RA 滑膜および non-RA 滑膜と関節液の LDH isozyme



LDH₅に最も高い活性が認められた(表8, 図3)。

d) non-RA の関節液と滑膜について

10例の non-RA 屍体の関節液の LDH 総活性は平均413 (190~610) u/ml で, その分画は, LDH₁ 8.2%, LDH₂ 19.1%, LDH₃ 34.5%, LDH₄ 20.2%, LDH₅ 18.0%であった(表9, 図3)。

4例の non-RA 滑膜の LDH 総活性は平均2790 (1710~4300) u/ml で, その分画は LDH₁ 10.3%, LDH₂ 29.9%, LDH₃ 28.3%, LDH₄ 16.9%, LDH₅ 14.6%であった(表10, 図3)。これを RA の関節液ならびに滑膜と比較した場合, 総活性においても, LDH₅においてもいずれも non-RA の方が低値に位置した。

e) 健常人(対照)血清について

教室員20例(♂11例, ♀9例, 年齢20~36才)の対照血清の LDH 総活性は, 平均400 (340~550)

(表9) non-RAの関節液における LDH 総活性値とそのアイソザイム (%)

pt. No.	LDH 総活性値	LDH ₁	LDH ₂	LDH ₃	LDH ₄	LDH ₅
1	250	9.5	27.2	29.1	16.4	17.8
2	650	6.1	20.2	35.6	20.5	17.6
3	550	8.9	10.0	39.0	23.6	18.5
4	330					
5	610					
6	190					
7	480					
8	470					
9	320					
10	280					
	413 ± 157.8	8.2 ± 1.8	19.1 ± 8.6	34.5 ± 5.0	20.2 ± 3.6	18.0 ± 0.5

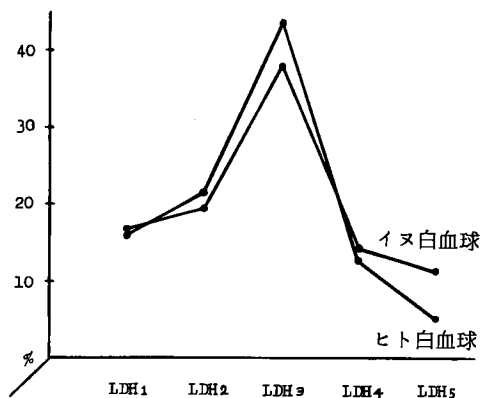
(表10) non-RAの滑膜における LDH 総活性値とそのアイソザイム (%)

pt. No.	LDH 総活性値	LDH ₁	LDH ₂	LDH ₃	LDH ₄	LDH ₅
1	2850	18.5	24.3	30.1	19.1	8.0
2	2300	7.4	39.7	21.9	11.5	19.6
3	1710	5.0	25.6	32.8	20.2	16.3
4	4300					
	2790 ± 1109.1	10.3 ± 7.2	29.9 ± 8.5	28.3 ± 5.7	16.9 ± 4.7	14.6 ± 6.0

u/ml で、うち5例のアイソザイム分画は LDH₁ 44.1%, LDH₂ 37.9%, LDH₃ 14.0%, LDH₄ 2.5%, LDH₅ 1.5% であった (表11, 図3)。この総活性値を RA 血清のそれと比較すると、RAの方が高値 ($P < 0.05$) であった。

f) ヒトおよびイヌ白血球のアイソザイム

(図4) ヒトおよびイヌ末血白血球の LDH isozyme



ヒト末梢血中の白血球のLDHアイソザイムは、LDH₁ 16.7%, LDH₂ 21.8%, LDH₃ 43.7%, LDH₄ 12.7%, LDH₅ 5.1% で、イヌの分画は各々16.8%, 19.6%, 38.3%, 14.1%, 11.2% となり、LDH₃をピークとする同様のパターンが形成された (図4)。

2) β -Gの総活性とアイソザイム分画

β -Gの総活性値については、RAの関節液に平均2578 (850~6166) u/dl/hr を示めし、RA血清の1328 (447~2547) u/dl/hr と比較すれば、関節液の方に著高 ($P < 0.001$) が認められた。

一方、OAの血清では、平均1040 (895~1222) u/dl/hr、OAの関節液では平均935 (281~2781) u/dl/hr で両者に差異はみられず、健康人血清の平均1309 (916~1785) u/dl/hr とともに RAの関節液ほどの高活性にははるかに及ばなかった。

健康人の関節液を採取することは困難なので、非リウマチ (non-RA) 疾患で死亡したヒト (食道癌、胃癌、肺癌、肝硬変症、子宮癌の5例) の膝関節から得た関節液について測定してみると、864 (441~1813) u/dl/hr で最も低値の活性が示された (表3)。

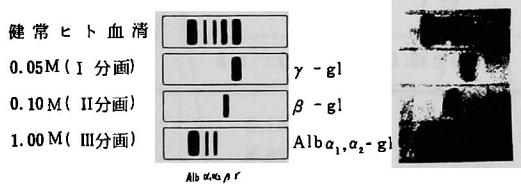
更に、滑膜については、6例の RA 滑膜で平均464

(表11) 健常人の血清における LDH 総活性値とそのアイソザイム (%)

No.	LDH 総活性値	LDH ₁	LDH ₂	LDH ₃	LDH ₄	LDH ₅
1	400	42.3	39.5	13.0	3.4	1.8
2	460	46.4	36.5	11.7	3.0	2.4
3	370	39.8	42.9	15.3	0.4	1.6
4	350	42.1	36.6	16.5	3.1	1.7
5	410	50.0	33.9	13.4	2.7	0
6	400					
7	440					
8	460					
9	380					
10	380					
11	370					
12	340					
13	550					
14	440					
15	440					
16	340					
17	350					
18	410					
19	360					
20	360					
	400±52.7	44.1±4.1	37.9±2.8	14.0±1.9	2.5±1.2	1.5±0.9

(図5)

セルローズ・アセテート膜電気泳動による DEAE
Sephadex A-50 画分の蛋白泳動パターン



(351~610) u/g/hr (臓器活性単位), non-RA 滑膜では平均 84 (46~179) u/g/hr で RA 滑膜の方に著明な高活性 ($P<0.001$) が認められた (表 3)。

β -G のアイソザイム分画は, 前述のように DEAE Sephadex A-50 カラムクロマトグラフィーで, 食塩濃度を異にする段階的溶出法によったが, 溶出されたそれぞれの分画は, セルローズ・アセテート膜電気泳動にて次の如く同定された。すなわち, NaCl 濃度 0.05 M で溶出された β -G は, 健常人血清の γ -グロブリン分画に相当する位置にみられ, 分画 I (β -G_I) とした。次いで 0.10 M NaCl で溶出され

た β -G は β -グロブリン分画に一致し, 分画 II (β -G_{II}) とした。1.00 M NaCl で溶出された β -G はアルブミン, α_1 および α_2 -グロブリンに位置し, 分画 III (β -G_{III}) とした (図 5)。

ここで, 各種被検体の β -G アイソザイムの分画比についてのべると, RA の関節液では, β -G_I 22.6%, β -G_{II} 26.8%, β -G_{III} 50.6% で β -G_{III} の高値がみとめられた。一方 RA の血清では, I・II・III 分画が各々 37.0%, 33.2%, 29.8% で分画比に殆んど差がみられず, また健常人血清の 41.4%, 27.8%, 30.8%, OA 関節液の 29.3%, 37.8%, 32.9%, OA 血清の 24.9%, 39.0%, 36.1% も RA 血清と同様に三つの分画の間に差がみられなかった。

次いで, 滑膜組織にみられた β -G アイソザイムの分画比は, RA の滑膜において, β -G_I 17.6%, β -G_{II} 24.7%, β -G_{III} 57.7% で, β -G_{III} に著明な高活性が認められたことは, RA の血清と同様であった。

2 例の非リウマチ疾患 (non-RA) で死亡した患者の屍体滑膜は総活性が低値をしめし, 分画比では, β -G_{III} が優位であった。

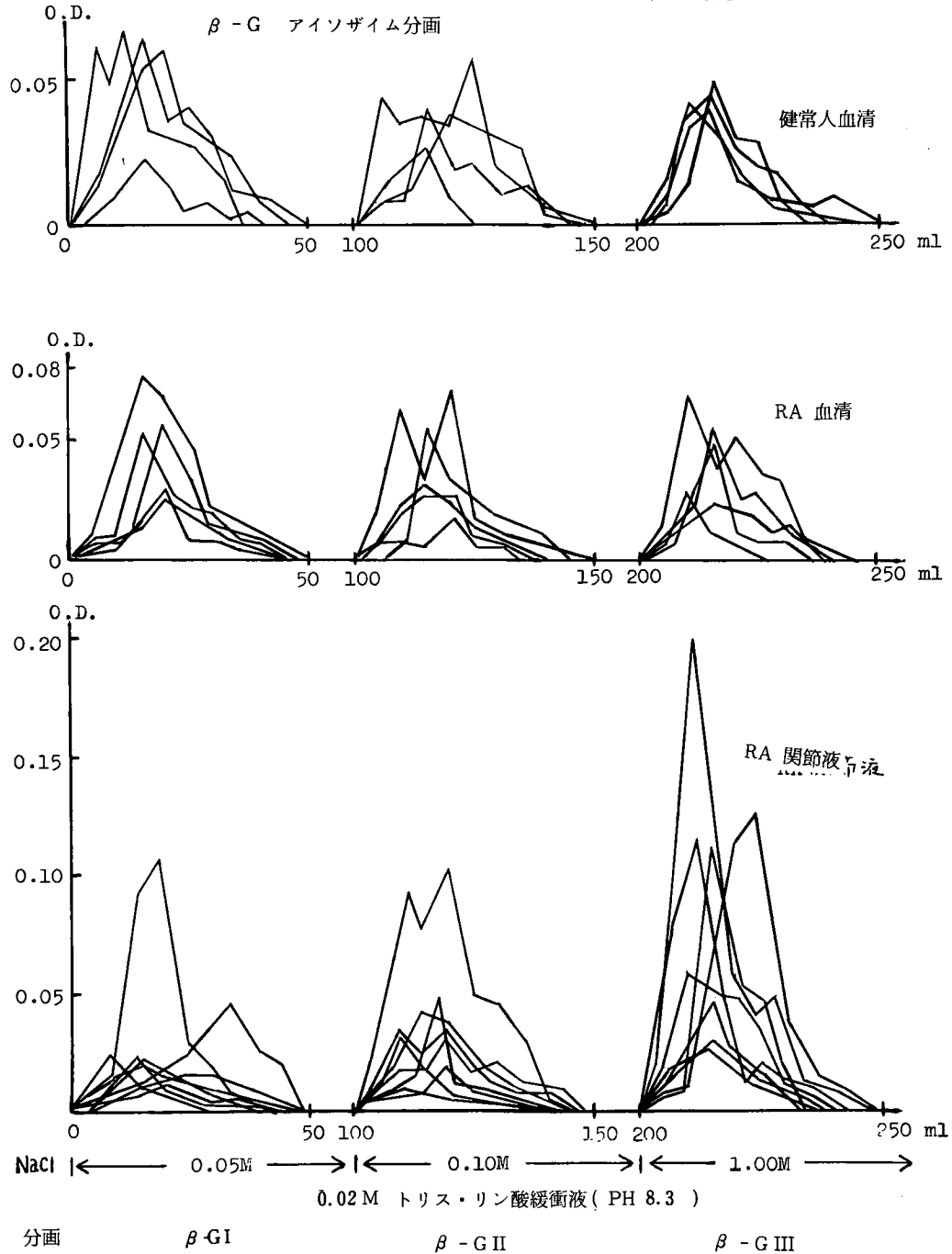
ヒト末梢血の白血球 2 例では, そのほとんどが

(表12) β -G総活性値 (U/dl/hr) とそのアイソザイム (%)

No	β -G総活性値	β -G I	β -G II	β -G III	
健常人血清	1	740	19.9	22.7	57.6
	2	1,300	45.8	31.7	22.5
	3	1,275	47.4	26.7	25.9
	4	1,920	52.8	29.9	17.2
	1,310± 482.3	41.4±14.7	27.8± 3.9	30.8±15.2	
R A 血 清	1	670	39.4	23.4	37.2
	2	1,240	50.0	17.2	32.8
	3	1,475	38.6	39.6	21.8
	4	1,987	22.4	42.5	35.2
	5	847	34.8	43.5	21.7
	1,246± 517.5	37.0± 9.9	33.2±12.1	29.8± 7.5	
R A 関節液	1	4,410	21.8	53.4	24.8
	2	2,420	31.5	19.2	49.3
	3	1,500	18.4	47.4	34.2
	4	4,000	29.4	16.8	53.8
	5	1,605	23.8	9.5	66.7
	6	1,950	14.5	30.9	54.5
	7	1,450	33.3	22.2	44.5
	8	2,080	8.3	15.0	76.7
	2,426± 1,149.2	22.6± 8.7	26.8±16.0	50.6±16.6	
O A 血 清	1	1,220	24.4	36.6	39.0
	2	640	13.2	45.6	41.2
	3	1,300	37.1	34.7	28.2
	1,025± 361.9	24.9±12.0	39.0± 5.8	36.1± 7.0	
O A 関節液	1	920	35.8	41.3	22.9
	2	764	21.1	36.8	41.1
	3	1,390	31.1	35.3	33.6
	1,055± 327.9	29.3± 7.5	37.8± 3.1	32.9± 9.6	
※ R A の 滑 膜 組 織	1	494	9.5	22.0	68.5
	2	351	10.6	23.9	65.5
	3	544	12.9	38.7	48.6
	4	610	15.5	18.5	66.0
	5	410	51.0	25.0	24.0
	6	375	6.5	20.3	73.2
	463.9± 104.3	17.6±16.6	24.7± 7.2	57.7±18.5	

※ RAの滑膜組織は臓器単位活性値: U/g/hr

(図6) DEAE Sepadex A-50 カラムクロマトグラフィーによる



β -G_{II}からなっていた。

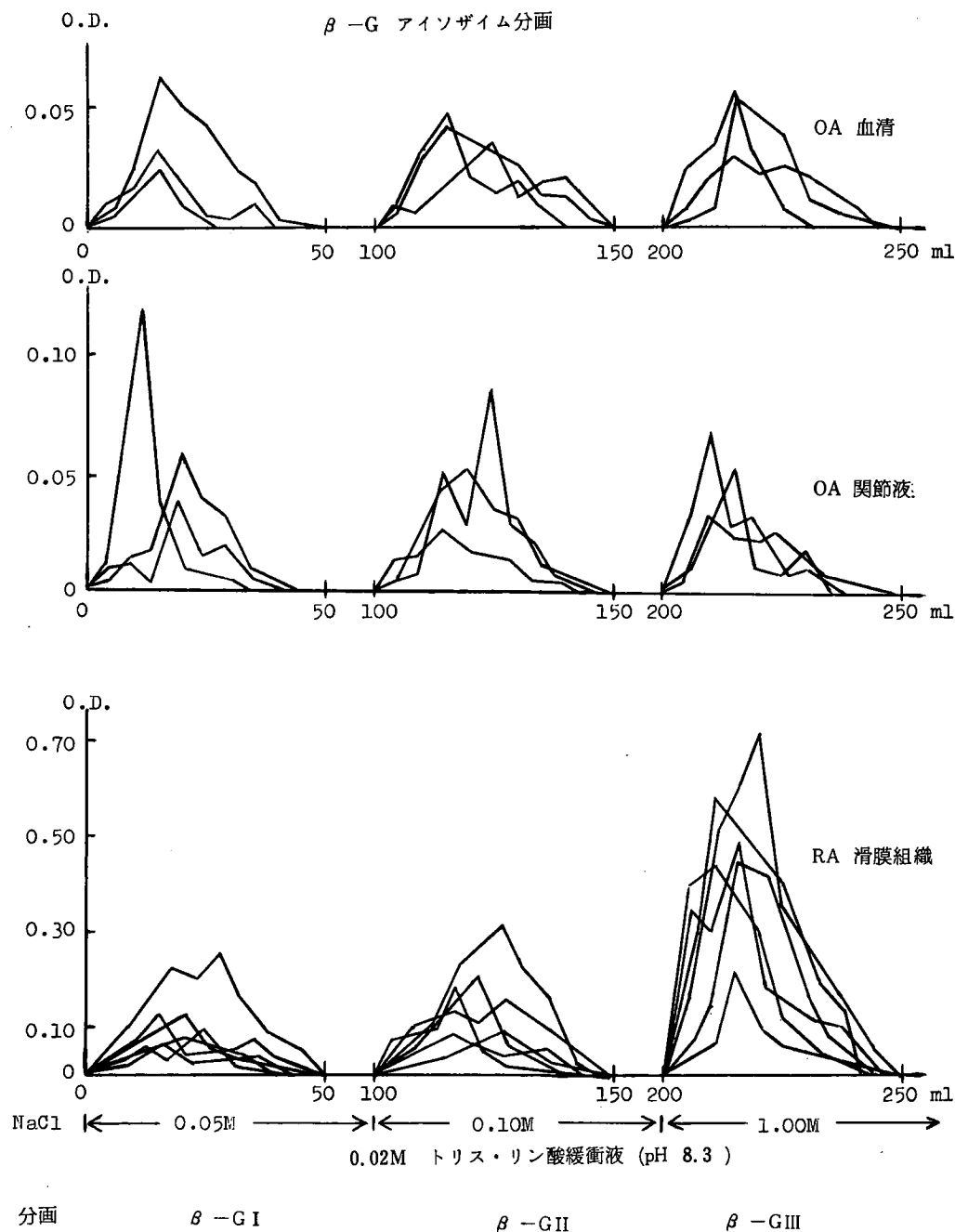
以上の結果から、 β -G_{III}分画の活性は、RAの関節液と滑膜に著高が認められた(表12, 図6, 7, 8)。

3) Ac-P 活性

Ac-Pの活性値は、RAの関節液では平均13.5 (2.6~30.0) 単位 (K. A. U) で、同血清の平均2.9 (0.4~7.5) 単位に比較すれば著明な高値を示した。OAの関節液と血清は、平均2.9 (0.8~12.0) 単位、2.1

(図 7)

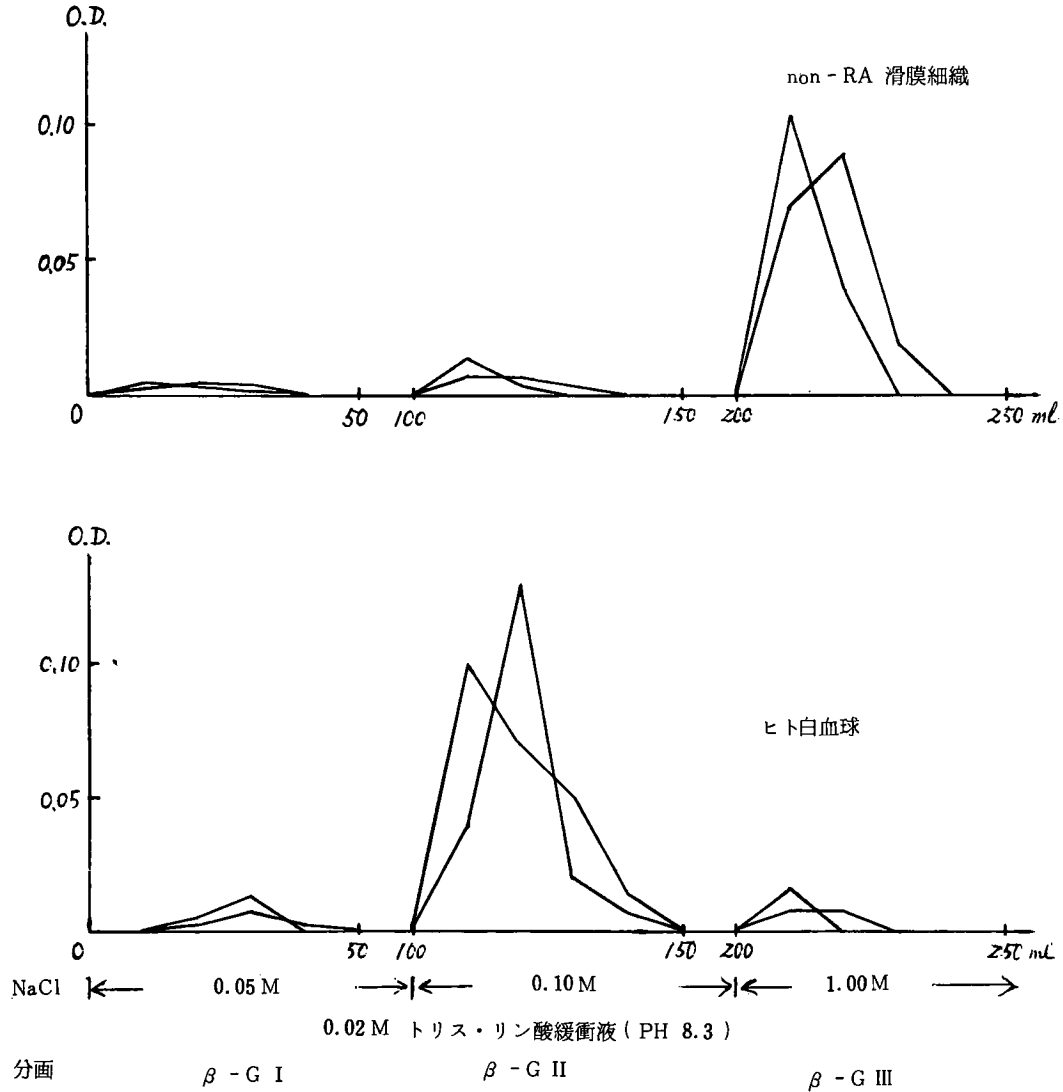
DEAE Sephadex A-50 カラムクロマトグラフィーによる

 β -G アイソザイム分画

(0.8~4.7) 単位, 健常人血清は2.7 (2.0~3.6) 単位で相互に有意差はなく, RA の関節液とはかなりの低値 ($P < 0.05$) に位置した (表 3)。

4) Al-P 活性

Al-P 活性は, 健常人血清での平均1.6 (0.9~2.7) 単位 (B. L. U) に対して, RA 血清, OA 血清は, 2.2 (0.7~3.9) 単位, 2.1 (0.8~4.3) 単位とやや高値であったが, 推計学的には有意差は認められな

(図 8) DEAE Sephadex A-50 カラムクロマトグラフィー
による β -G アイソザイム分画

かった。関節液では RA, OA それぞれ 1.0 (0.2~1.9) 単位, 1.0 (0.1~2.1) 単位で, 血清中のそれに比較すれば逆に低値を示した。

non-RA の関節液, 滑膜においては, 0.7 (0.3~1.1) 単位, 0.2 (0.1~0.3) 単位でかなりの低活性であった (表 3)。

第 5 章 考 按

RA の関節液に LDH^{(8) (9) (10) (21)} や β -G^{(1) (22)} Ac-P^{(23) (24)} 等の酵素活性が上昇していることは, すでに幾多の

報告があり, 江沢⁽²⁵⁾ および著者らも過去に述べてきた。周知の如く, LDH は生体のほとんどすべての細胞に存在⁽²⁶⁾ する intracellular enzyme で, β -G, Ac-P は hydrolytic enzyme の代表的なものである。これら酵素の isozymic な分析からリウマチ疾患における活性上昇の由来を問うことは誠に興味深いものと思われる。

関節液中の LDH 活性が高値を示す原因として, West⁽⁷⁾ らが述べているように, 1) 関節液中の白血球から酵素が放出される 2) 壊死性または炎症性の

滑膜組織より酵素が遊離するハ) 再生された滑膜組織によって酵素の生産の増大および放出がなされるなどが考えられる。

白血球から酵素が放出される根拠として、関節液中の白血球の数と LDH 活性の間に正の相関のあること^{7) 10) 27)}とが挙げられている。しかし白血球を遠沈分離したものとししないものとの間で LDH 活性値に驚くほど僅かの差異しか認められていないが、これは白血球中の酵素がすでに放出されていたためであろうと推論されている。

関節液中の白血球数と酵素活性については、LDH のみならず β -G²²⁾ および Ac-P²³⁾ についてもその関連性が認められているが、これらの酵素を滑膜の側からながめてみれば、Jasani⁹⁾ ら、石原¹⁰⁾ Granda²⁸⁾ らの述べるように RA の滑膜には異常に高い LDH, β -G, Ac-P の活性が含まれ、今回の LDH, β -G の研究でも RA の滑膜には non-RA 屍体滑膜とは比べべくもない高値でその活性が証明された。このことは、炎症性滑膜から遊離する酵素が RA の関節液中の高活性に大きく関与しているであろうことを示唆する。更に興味あることは、白血球では多形核白血球にのみ存在する Al-P²⁹⁾ の活性が、同血球の著明に増加した RA の関節液に、これと比例した高値に認められず、血清と同値かむしろ低い値の成績が得られたことである。

Granda²⁸⁾ らは、RA 滑膜の Cathepsin-D 活性が関節炎症の強さに比例し、同時に測定した滑膜の β -G および Ac-P 活性が Cathepsin-D と関連することを認めて、滑膜中に hydrolytic enzyme の活性が亢進していることを指適し、Lehman²⁴⁾ らは、関節液中の hydrolytic enzyme の大部分が白血球の lysosome から由来するのではなく、滑膜細胞の lysosome に由来するものであらうと述べている。

以上述べたことより、関節液の酵素活性が、関節液内の遊走白血球のみならず、炎症性滑膜からも由来することが考えられるが、次に述べる LDH および β -G のアイソザイムをみることによって、炎症性滑膜が酵素由来の大きな要因であることが一層印象づけられる。

LDH のアイソザイムでは、諸家^{8) 10) 27)}と同様に RA の関節液中に LDH₅ の最高活性値 (35.7%) を得たが、RA 滑膜ではこれを上回る高活性値 (39.3%) が認められた。一方、ヒトおよびイヌの白血球より得た LDH₅ は各々 5.1%, 11.2% の低値であった。この白血球は末梢血中のものであり、炎症の場におけ

るものではないので、この測定値から直ちに白血球由来の酵素活性は乏しいと決めるのは早計であろうが、石原¹⁰⁾によれば炎症の場すなわち RA の関節内白血球の LDH₅ は 22% で、炎症の場でない末梢血中の白血球のそれは 19% とほとんど差異のないことをのべている。

以上の成績から、炎症性滑膜から関節液中への酵素の移動が存在することが推定される。

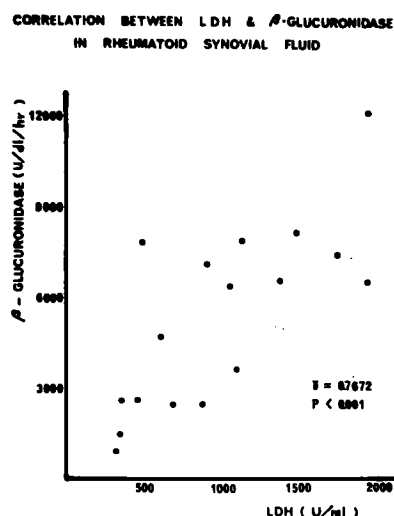
次いで β -G のアイソザイムに言及すれば、3 つに分画された β -G 活性のうち特に注目されるのは、RA の関節液において β -G_m が 50.6% の高活性を示したことである。その他は RA 血清で 29.8%, OA の関節液および血清で 32.9%, 36.1%, 健常人血清では 30.8% の低い値にとどまった。滑膜では、RA の滑膜にやはり β -G_m の著明な高活性 (57.7%) がみられ、non-RA の滑膜では低い総活性値ながらもそのアイソザイム分画のほとんどが β -G_m に集中していた。このことは、 β -G_m は元来滑膜中に多く存在する酵素ではなかろうかと想像される。ちなみに健常人白血球の β -G はほとんど β -G_m から構成されていた。従って RA の関節液に β -G の高活性のみられる原因は、主として β -G_m の占める割合に依存し、それは炎症性滑膜に由来するものであらうと考えられる。

RA と non-RA の滑膜を比較すれば、RA 滑膜の方に LDH (LDH₅ も)、 β -G とともに数倍する高活性がみられたが、これは組織学的にみた RA の滑膜の lining cell の肥大や増生および円形細胞の浸潤、Pannus の形成^{31) 32)}等の存在からうかがい知ることができ、関節液中の活性上昇に当然大きく影響しているものと思われる。

ひとり RA の血清にのみ他の血清と比較して LDH と LDH₅ の活性がやゝ高く認められたが、これを単に関節液から血中への移行とばかり解釈するのは早計の様に思われる。何故ならば、Kendall³³⁾ らが、リウマチ患者の血清にしばしば Al-P 活性の上昇がみられるが、これが肝疾患に特異的に上昇する 5-nucleotidase 活性と相関することから、この Al-P 活性の上昇は骨性でなく肝性由来であらうと推論しているからである。たしかにリウマチ患者の長期に亘る炎症がもたらす全身的な変調ならびに投与される薬剤などが肝臓に及ぼす影響を無視することはできないであらう。

同時に測定した 17 例の RA 関節液の LDH と β -G 活性は正の相関 ($r=0.7622$, $P<0.001$) がみられ

(図 9)



たが(図9)、Jasani⁹⁾らも関節液中のLDHおよび β -Gが共にAc-P活性と相関することを述べている。すなわち氏は、lysosomal enzymeとintracellular enzymeが平行して高活性にあるということから、関節液への酵素遊出の機序はlysosomal membraneのみに特異な変化が起ったと云うよりはむしろ細胞全体の透過性の変化や細胞死に起因するのであろうと述べている。

関節液中の酵素が炎症性滑膜に由来するメカニズムを総括的にとらえれば、Ⅰ)炎症組織における酵素生産の増大、Ⅱ)炎症組織からの酵素の遊出、Ⅲ)滑膜細胞の細胞透過性の変化、Ⅳ)炎症性滑膜細胞の物理的破壊等諸因子の介在が考えられるが、未だ未知の分野も多く今後さらに究明されるべき問題であろう。

なお、現在3つないし4つに分画される β -Gアイソザイムは、その測定法において時間と労力を要し、また各分画の臓器由来についても不明の部分が多いため、LDHのアイソザイムを異って実用的な臨床応用には至っていないのが現状である。

第6章 結 論

RAの関節液を中心にLDHとそのアイソザイム、 β -GとそのアイソザイムならびにAc-PとAl-Pの酵素活性を測定した。

1) RAの関節液中にLDH、 β -G、Ac-P活性が著明な高値でみられ、OAおよびnon-RAの関節液に

比して有意の差が認められたが、Al-P活性は低値であった。またRAの滑膜にもnon-RA滑膜に比してLDH、 β -G活性の著明な高活性が認められた。

2) RA関節液のLDH総活性値は平均1640u/mlで、そのアイソザイムはLDH₁17.0%、LDH₂16.1%、LDH₃16.1%、LDH₄16.7%、LDH₅35.7%であった。一方、RA血清の総活性値は473u/mlで、その分画はLDH₁39.2%、LDH₂36.7%、LDH₃10.6%、LDH₄6.8%、LDH₅6.7%となり、関節液の方に総活性値とLDH₅の著明な高値が認められた。

3) OA関節液のLDH総活性値は、平均453u/mlで、その分画はLDH₅に对照血清と比べてやゝ高い活性が認められたが、 β -GやAc-Pについては殆んど差異が認められなかった。

4) RAの滑膜のアイソザイム分画は、LDH₁1.4%、LDH₂3.8%、LDH₃17.5%、LDH₄38.0%、LDH₅39.3%で、RA関節液と同様にLDH₅の活性が高かったが、non-RA滑膜ではLDH₁10.3%、LDH₂29.9%、LDH₃28.3%、LDH₄16.9%、LDH₅14.6%でLDH₅の活性上昇はみられなかった。

5) ヒトの白血球のLDHアイソザイムは、LDH₁16.7%、LDH₂21.8%、LDH₃43.7%、LDH₄12.7%、LDH₅5.1%で、LDH₃に活性のピークがみられ、LDH₅は低値に示された。

6) β -Gのアイソザイムは今回の研究で3つに分画された。RAの関節液と滑膜にのみ β -G_mの活性上昇が認められたが、対照としたRA血清、OA血清、OA関節液および健常人血清には β -G_I、 β -G_{II}の間に差異が認められなかった。

7) ヒト末梢白血球の β -Gアイソザイムはそのほとんどが β -G_mに集中し、non-RAの滑膜のそれは β -G_mが優位であった。

8) RAの関節液にみられる酵素活性の上昇は主として炎症性滑膜に由来するものであろうと推測される。

稿を終えるに臨み、御懇篤な御指導と御校閲を賜った恩師大藤真教授に深甚の謝意を捧げるとともに、日夜御指導御鞭撻をいただいた江沢英光講師、資料提供に御協力いただいた関係諸氏に厚くお礼申し上げます。

(本論文の要旨は、第14、15、16回日本リウマチ学会において発表した)

文 献

- 1) Neilands, J. B.: Studies on lactic dehydrogenase of heart. *J. Biol. Chem.*, **199**: 373-381, 1952.
- 2) Vesell, E. S. and Bearn, A. G.: Localization of lactic acid dehydrogenase activity in serum. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **94**: 96-99, 1957.
- 3) Wroblewski, F.: Enzymes in clinical chemistry (Proc. 2nd International Symposium on Enzymes), p. 385, Butterworth, 1962.
- 4) Wieme, R. J.: An improved technique of agar-gel electrophoresis on microscope slides. *Clin. Chem. Acta.*, **4**: 317-321, 1959.
- 5) van der Helm, H. J.: A simplified method of demonstrating lactic dehydrogenase isozymes in serum. *Clin. Chem. Acta.*, **7**: 124-128, 1962.
- 6) Vesell, E. S., Osterland, K. C., Bearn, A. G. and Kunkel, H. G.: Isozymes of lactic dehydrogenase; Their alterations in arthritic synovial fluid and sera. *J. Clin. Invest.*, **41**: 2012-2019, 1962.
- 7) West, M., Poske, R. M., Black, A. B., Pilz, C. G. and Zimmerman, H. J.: Enzyme activity in synovial fluid. *J. Lab. Clin. Med.*, **62**: 175-183, 1963.
- 8) Cohen, A. S.: Lactic dehydrogenase (LDH) and transaminase (GOT) activity of synovial fluid and serum in rheumatic disease states, with a note on synovial fluid LDH isozymes. *Arthritis Rheum.*, **7**: 490-501, 1964.
- 9) Jasani, M. K., Katori, M. and Lewis, G. P.: Intracellular enzymes and kinin enzymes in synovial fluid in joint diseases. *Ann. rheum Dis.*, **28**: 497-512, 1969.
- 10) 石原義彦: 慢性関節リウマチとその類似疾患に於ける血清、関節液の乳酸脱水素酵素及びそのアイソザイムの研究. *リウマチ*, **10**: 316-333, 1970.
- 11) Moore, B. W. and Robert, H. L.: Chromatography of rat liver soluble proteins and localization of enzyme activities. *J. Biol. Chem.*, **235**: 1359-1364, 1960.
- 12) 正木繁: β -Glucuronidase isozyme による癌の酵素化学的診断に関する研究. *大阪大学医学雑誌*, **19**: 517-529, 1967.
- 13) 平木潔, 原田英雄: β -Glucuronidase アイソエンザイム. *内科*, **29**: 811-814, 1972.
- 14) 山村雄一, 正木繁: β -Glucuronidase ——肺癌——. *内科*, **29**: 804-810, 1972.
- 15) Dioguardi, N., Agostoni, A., Fiorelli, G. and Lomanto, B.: Characterization of lactic dehydrogenase of normal human granulocytes. *J. Lab. Clin. Med.*, **61**: 713-723, 1963.
- 16) Yakulis, V. J., Gibson, C. W. and Heller, P.: Agar gel electrophoresis for the determination of isozymes of lactic and malic dehydrogenase. *Am. J. Clin. Path.*, **38**: 378-382, 1962.
- 17) 浅野健夫, 小野昌利, 石川允, 深津栄一, 鷹野護.: 血液疾患における血清乳酸脱水素酵素とそのアイソザイムの臨床的意義について. *臨床血液*, **5**: 326-332, 1964.
- 18) 大島由紀子: 悪性腫瘍における乳酸脱水素酵素とその Isozyme に関する研究. *岡山医学会雑誌*, **79**: 453-463, 1967.
- 19) 吉田光孝, 北村元仕: LDH アイソザイム. *臨床病理*, 臨時増刊特集 **12**: 96-109, 1967.
- 20) 貞広隆造, 大久保一衛, 川田稔: β -グルクロニダーゼに関する研究. *生化学*, **34**: 503, 1961.
- 21) West, M., Poske, R., Black, A., Pilz, C. and Zimmerman, H. J.: Enzyme activity in synovial fluid. *Arthritis Rheum.*, **5**: 328-329, 1962.
- 22) Jacox, R. F. and Feldmann, A.: Variation of beta glucuronidase concentration in abnormal human synovial fluid. *J. Clin. Invest.*, **34**: 263-267, 1955.
- 23) Smith, C. and Hamerman, D.: Acid phosphatase in human synovial fluid. *Arthritis Rheum.*

- 5 : 411-414, 1962.
- 24) Lehman, M. A., Kream, J. and Brogna, D.: Acid and alkaline phosphatase activity in the serum and synovial fluid of patients with arthritis. *J. Bone Jt. Surg.*, **46-A** : 1732-1738, 1964.
- 25) 江沢英光, 業天洋三, 大原敦, 寺見武人, 大熊智恵子: 関節リウマチにおける酵素活性とその由来. *日本医事新報*, No.2512 : 12-15, 1972.
- 26) 森昌彦: Tetrazolium 塩を用いる酸化還元酵素. '酵素組織学', 武内, 清水, 小川編, 朝倉書店. P. 105-124, 1969.
- 27) Veys, E. M. and Wieme, R. J.: Lactate dehydrogenase in synovial fluid. *Ann. rheum. Dis.*, **27** : 569-575, 1968.
- 28) Granda, J. L., Ranawat, C. S. and Posner, A. S.: Levels of three hydrolases in rheumatoid and regenerated synovium. *Arthritis Rheum.*, **14** : 223-230, 1971.
- 29) Phelps, P., and McCarty, D. J. Jr.: Crystal-induced inflammation in carine joints. II. Importance of polymorphonuclear leukocytes. *J. Exp. Med.*, **124** : 115-125, 1966.
- 30) Ropes, M. W. and Bauer, W.: Synovial fluid changes in joint disease. *Harvard Univ. Press*, Cambridge, Mass., P. 9, 1953. (cited from 24)
- 31) Weissmann, G., Spilberg, I. and Krakauer, K.: Arthritis induced in rabbits by lysates of granulocyte lysosomes. *Arthritis Rheum.*, **12** : 103-115, 1969.
- 32) Sokoloff, L.: The pathology of rheumatoid arthritis and allied disorders. in 'Arthritis and Allied Conditions', ed. J. L. Hollander, 7 th ed., Lea and Febiger, Philadelphia. P. 187-210, 1966.
- 33) Kendall, M. J., Cockel, R., Becker, J. and Hawkins, C. F.: Raised alkaline phosphatase in rheumatoid disease. *Ann. rheum. Dis.*, **29** : 537-540, 1970.

Pathogenetic and Clinical Studies in Rheumatoid Arthritis

Part I : Enzymological Observation on Serum, Synovial Fluid and Synovial Membrane in Patients with Rheumatic Disease

By Yozo Gyoten

Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School
(Director: Prof. Tadashi Ofuji)

The activities of four enzymes lactic dehydrogenase (LDH) with its isozymes, beta-glucuronidase(beta-G) with its isozymes, acid and alkaline phosphatases, were studied in serum, synovial fluid and synovial membrane obtained from 45 patients with rheumatoid arthritis (RA) and 17 patients with osteoarthritis (OA) .

The control group comprised sera from 20 normal subjects, synovial fluid and membrane from 10 patients who had no clinical evidence of joint disease prior to death and leukocytes isolated from normal human peripheral blood.

The LDH isozyme was identified five fractions by means of agar gel electrophoresis, and the beta-G isozyme was shown to be composed of three fractions by the method using DEAE Sephadex A-50 column chromatography: beta-G I activity in serum has been localized in gamma globulin, beta-G II in beta-globulin, and beta-G III in alpha 1, alpha 2-globulin and albumin regions. In the present study, the author obtained the results as follows.

1) The activities of LDH, beta-G and acid phosphatase in synovial fluid from RA patients were extremely increased and significantly higher than from OA patients or cadavers, but alkaline phosphatase activity remained in low level.

2) The total LDH activity in rheumatoid synovial fluid was 1640u/ml, and 473u/ml in rheumatoid serum ($P<0.001$) Their isozyme patterns demonstrated qualitatively increased amounts of LDH-5 (35.7%) in rheumatoid synovial fluid and LDH-1 (39.2%) , LDH-2 (36.7%) in rheumatoid serum.

3) The activities of LDH, beta-G, acid and alkaline phosphatases in synovial fluid from OA patients were not increased (approximately to the values of normal human serum) , but its LDH-5 (22.5%) was minimally elevated.

4) Rheumatoid synovial membrane also revealed a significantly higher LDH-5 activity(39.3%) than in cadavers (14.6%) .

5) The isozyme of leukocytes was found to be characterized by increased amounts of LDH-3 (43.7%) and no increase of LDH-5 (5.1%) .

6) In regard to beta-G isozymes, only beta-G III activity was significantly elevated in rheumatoid synovial fluid (50.6%) and rheumatoid synovial membrane (57.7%) .

7) The beta-G isozyme of leukocytes comprised large amounts of beta-G II, and beta-G III was prominent in synovial membrane of cadavers.

8) These results suggest that raised enzyme activities in rheumatoid synovial fluid have been derived mainly from inflamed synovial membrane rather than from synovial leukocytes.