

岡山医学会雑誌

第93巻7,8合併号(第1040,1041号)

昭和56年8月30日発行

慢性関節リウマチにおける酵素学的研究

第 1 編

慢性関節リウマチのコラゲナーゼ活性ならびに モノアミノキシダーゼ活性について

岡山大学医学部第三内科

戸 田 俊 介

(昭和56年5月6日受稿)

Key words: 慢性関節リウマチ, コラゲナーゼ活性
モノアミノキシダーゼ活性

諸 言

慢性関節リウマチ(以下RAと略す)は関節を主病変とする全身性の疾患であるが、関節の構築物質としてcollagenは支持蛋白の約1/3を占め、骨、軟骨、滑膜は主としてこのcollagenより成り立っているものである。collagenaseはこのcollagenを生理的な条件下で分解する唯一の酵素として知られている。collagenaseはcollagen線維のアミノ末端より1:3の位置で特異的に分解し¹⁾、可溶性のcollagenに至らしむる。collagenase活性は自然界においてオタマジャクシ変態²⁾の際に尾に高い活性が見い出されて以来、細菌においてもclostridium histriticum³⁾、生体においては末梢血好中球⁴⁾、分娩后子宮⁵⁾、糸球体基底膜⁶⁾、肝組織⁷⁾、胃潰瘍周辺粘膜⁸⁾、眼科疾患⁹⁾、歯科疾患¹⁰⁾、癌組織¹¹⁾、ヒト皮フ¹²⁾、創傷治癒部¹³⁾等、結合組織の代謝が盛んな部位、

時期に主として高い活性が見い出されている。一方RAの炎症の場合においてはEvanson¹⁴⁾によりRA滑膜培養においてcollagenase活性が見い出されているが、関節局所をとってみると、RAの炎症が発症して関節の強直に至る一連の炎症の過程では滑膜・軟骨・骨の強い炎症、それに伴うcollagenの新生と分解吸収が絶えず繰り返されているわけである。このような場所でcollagenaseが大きな役割を演じているであろうことは容易に想像がつくことである。そこで著者はRAの関節炎症においてこのcollagenase活性が、どのような役割を演じているかを検討する為にRA患者の関節液中のcollagenase活性、加えて末梢血並びに関節液中の白血球のcollagenase活性を測定しRAの炎症との関係を検討した。一方、肝¹⁵⁾、心疾患¹⁶⁾において臓器の線維化を反映する酵素としてmonoamine-oxidase(以下MAOと略す)が知られているが、

従来は主としてミトコンドリア内の MAO¹⁷⁾ についての研究がなされていたが、最近結合組織代謝における MAO の役割が注目されるに至った。RA の関節炎症の過程は、先づ滑膜に炎症がおり、軟骨、骨破壊へ進展し遂には関節の強直を来たすものとも考えられる。この経過は、とりもなおさず関節の線維化ということで結論づけられる。このことから当然 RA の関節炎症の進展に MAO が影響を及ぼすことが容易に想像される。このような考えのもとに、著者は RA の血中、並びに関節液中の MAO 活性を測定し、RA の関節炎症との関連を検討した。

対 象

collagenase 活性の測定にあたっては、岡山大学附属病院外来並びに入院の RA 患者で、アメリカリウマチ協会 (ARA) 診断基準で definite 及び classical RA 患者 43 名を対象とし、末梢白血球 collagenase 活性ならびに血清 MAO 活性の control として正常人 12 名、関節液中 collagenase 活性ならびに MAO 活性の control として変形性関節症 (以下 OA と略す) 患者 9 名より検査材料を採取した。

〈実験材料〉

① ¹⁴C-glycine 標識コラーゲン

永井ら¹⁸⁾の方法により、モルモット腹腔内に ¹⁴C-glycine を投与し、その皮膚より ¹⁴C-glycine 標識コラーゲンを抽出精製し、比活性 1200cpm/mg、最終濃度 0.4% (W/V) となるように 0.005 M 酢酸に溶解し、これを collagenase 活性測定の基質とした。なお実験に供するまで 4℃ で冷蔵保存した。従来の Gel 法¹⁹⁾による collagenase 活性の測定には上記の、0.4% ¹⁴C-glycine 標識コラーゲン溶液 0.2ml に 0.4M NaCl, 10mM CaCl₂ を含む 0.1M Tris-HCl 緩衝液 pH7.8 (以下 0.1M Tris-NaCl-CaCl₂ と略) を 0.2ml 加え、よく混合した後、35℃ で 1 昼夜 incubation し、線維形成したものを基質として用いた。

② 好中球 (末梢血) collagenase 溶液

岡山大学医学部附属病院第三内科の外来及び入院の RA 患者、および正常人対照として当科医局員より採血した Heparin 加新鮮血 5ml より Dioguardi ら²⁰⁾の方法により、0.83% 塩化アンモ

ン溶液による溶血法により分離し、得られた好中球は 1.5ml の 0.2M NaCl および 5mM CaCl₂ を含む 0.05M Tris-HCl 緩衝液 pH7.8 (以下 0.05 M Tris-NaCl-CaCl₂ と略す) に懸濁後、凍結融解を 3 度繰り返し 10,000 g で 10 分間遠沈し、その上清 (蛋白 0.5~1.1mg を含) を酵素溶液として用いた。

③ 関節液 collagenase 溶液

岡山大学医学部附属病院第三内科外来及び入院の ARA criteria で definite 及び classical の RA 患者の膝関節より無菌的に穿刺し、得られた関節液を白血球用メランジュールで白血球数 (個/mm³) を測定後、関節液 10ml につき Heparin 溶液 250 単位 (0.5ml) を加え、2000 rpm で 5 分間遠沈し、その上清を関節液 collagenase 活性測定の酵素溶液とした。

④ 関節液白血球 collagenase 活性

上記の如く関節液を採取し、直ちに遠沈しその上清を除いたものに、Tris-HCl 緩衝液を加えて計 2 ml とし、クボタの超音波ホモゲナイザーにて homogenate し、それを酵素溶液とし実験に供するまで凍結保存した。

方 法

① 溶液法による collagenase 活性の測定

寺戸ら²¹⁾の方法により次の如く行った。

glucose を含む ¹⁴C-標識コラーゲン溶液 (前記) 0.2ml に任意の酵素量を含む 0.2ml の 0.05 M Tris-NaCl-CaCl₂ を加え、35℃ で一定時間 (2~4 時間) 反応後、20μl の 80mM 0-phenanthroline 溶液を加え反応を停止した。反応停止後、さらに 35℃ で 60 分間 incubate し、分解産物を変性後、室温に冷却し、0.4ml の dioxane を加え激しく攪拌した後、6000 rpm で 10 分間遠沈し、残った未分解コラーゲンを沈澱せしめた。その上清 0.5ml を 10ml の Bray 溶液²²⁾ に加え、放射活性を測定し、collagenase 活性とした。(cpm/ml·hr)

② ゲル法による collagenase 活性の測定

永井ら¹⁹⁾の方法により次の如く行った。

¹⁴C-標識コラーゲンの再生線維から溶出される放射活性を collagenase 活性とした。0.4mM のコラーゲンゲル (実験材料の項参照) に 0.2ml の

酵素溶液を含む0.05M Tris-NaCl-CaCl₂を加え、35℃または37℃で一定時間反応后、6000rpmで10分間遠沈し、その上清の放射活性を測定し collagenase 活性 (cpm/ml. hr) とした。

③ 関節液中酸性 phosphatase 活性の測定

前述の如く、患者の膝関節より採取した関節液より細胞成分を遠沈し、除去したものの酸性 phosphatase 活性を測定した。

④ 関節液中 β -glucuronidase 活性の測定

β -glucuronidase 活性の測定は、前述と同様の方法で関節液を採取し、塚本氏のP-Nitrophenyl glucuronide を基質として測定した。

⑤ MAO 活性の測定

和光純薬の MAO テストワコーを使用した。

以上の如くに測定した RA 患者の関節液中 collagenase 活性を、正常対照とした OA 患者の

表 1

| Collagenase activities in synovial fluids | | | | |
|---|-------------|------------|--------------------|------------|
| case | not treated | | treated with 3M-KI | |
| | Gel meth. | Sol. meth. | Gel meth. | Sol. meth. |
| 1 | 5 | 20 | 1390 | 21000 |
| 2 | 5 | 320 | 550 | 720 |
| 3 | 6 | 80 | 71 | 640 |
| 4 | 10 | 160 | 706 | 3120 |
| 5 | 3 | 40 | 350 | 680 |
| 6 | 0 | 30 | 51 | 280 |
| 7 | 5 | 60 | 1110 | 20500 |
| 8 | 11 | 30 | 1350 | 8320 |
| 9 | 3 | 50 | 344 | 1360 |
| 10 | 22 | 60 | 990 | 11200 |
| 11 | 18 | 60 | 320 | 440 |
| 12 | 2 | 70 | 784 | 5800 |
| 13 | 6 | 50 | 861 | 5600 |
| 14 | 3 | 30 | 990 | 4640 |
| 15 | 7 | 80 | 890 | 9040 |
| 16 | 1 | 0 | 407 | 480 |
| 17 | 17 | 50 | 11 | 40 |
| 18 | 0 | 90 | 16 | 320 |
| 19 | 2 | 110 | 258 | 480 |
| 20 | 0 | 70 | 470 | 3440 |
| 21 | 3 | 70 | 940 | 10640 |
| 22 | 1 | 130 | 426 | 1840 |

p; n.s r=0.829 cpm/ml/hr
p<0.01

関節液中 collagenase 活性と比較し、その差を検討した。また RA については、全身性の活動性の指標と言われている血沈(mm/h), CRP テスト、また RA テスト、Steinbrocker の分類による stage との関連性、また RA の局所の炎症の程度を反映すると考えられる関節液中の酸性 phosphatase 活性、 β -glucuronidase 活性、関節液中白血球数等との関係を検討し、RA の炎症における collagenase 活性の役割を検討した。

結 果

① collagenase 活性測定法について：Gel法と溶液法との比較

collagenase 活性測定に際し、従来からの Gel 法と寺戸ら²¹⁾による溶液法により測定し、両者の間の関係を検討した(表 1), (Fig. 1). 22例の関節液 collagenase 活性について測定した結果、活性型では両者の間に相関が認められず、3M-KI で透析したものでは、相関係数 0.829 で両測定法の間に関係性が認められた。

② 末梢血白血球の collagenase 活性

末梢血白血球を塩化アンモン法により抽出し、1 ml の Tris-HCl-緩衝液に浮遊させ、単位蛋白当りの collagenase 活性を測定し、RA 群と正常

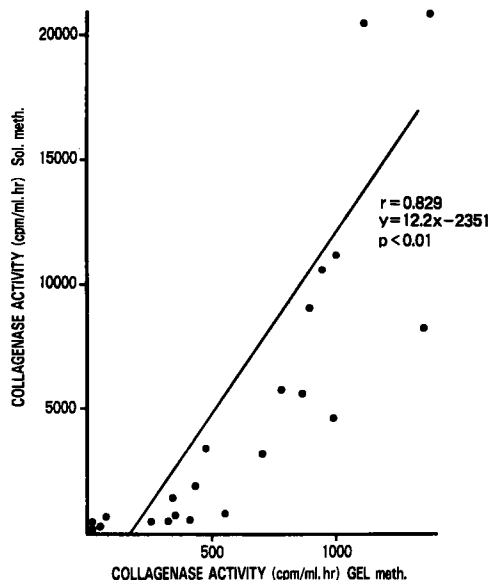


Fig. 1. Collagenase activity in gel method and solution Method.

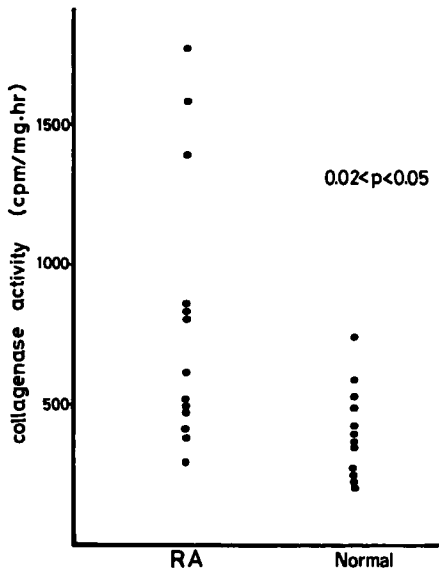


Fig. 2. Collagenase activity in peripheral leukocytes.

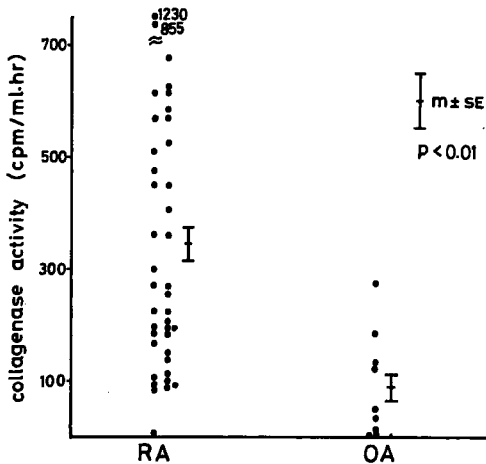


Fig. 3. Collagenase activity in synovial fluids

群で比較した。RA 群の平均値(M±SE) 777.0 ± 86.0cpm/ml. hr. 正常群の平均値 (M±SE) 393.2 ± 29.9cpm/ml. hr. であり、RA 群の方が正常群に比して有意に高値を認めた(Fig. 2).

③ 関節液中 collagenase 活性について RA と OA との比較

RA 群38例, OA 群9例について, 患者の膝関節より関節液を採取し, 直ちに細胞成分を遠沈し除去した上清について collagenase 活性を測定した。RA 患者に対して, 対照として OA 患

者関節液を使用した。RA患者38例の平均値(M±SE) は345.9 ± 29.0cpm/ml. hr., OA 患者の平均値 (M±SE) は90.2 ± 21.5 cpm/ml. hr. と, RA 患者関節液 collagenase活性はOA患者のものに比して有意な高値を認めた(Fig. 3).

④ 関節液 collagenase 活性と血沈との関係

RA 炎症の全身的な活動性の指標として用いられる血沈: 1時間値50mm以下群と, 51mm以上群に分けて collagenase 活性を比較した。50mm以下群の平均値(M±SE) は258.4 ± 52.8cpm/ml. hr, 51mm以上群の平均値(M±SE) は 356.6 ± 43.4cpm/ml. hrと, 51mm以上群(全身性の活動性の高い群)の方に, 関節液collagenase 活性の高値を認める傾向があったが, 統計学上の有意差は認められなかった(Fig. 4).

⑤ 関節液 collagenase 活性と CRP との関係

同様に血沈とともに, 全身性の活動性の指標としてよく用いられる CRP との関係を検討した。CRP 2(+)またはそれ以下群と, CRP 3(+)以上群に分けて, その各々の関節液collagenase 活性を比較した。比較的活動性の低い群, 即ち CRP 2(+)またはそれ以下群の平均値(M±SE) は382.0 ± 62.8cpm/ml. hr., CRP 3(+)以上群の平均値(M±SE) は287.1 ± 34.6cpm/ml. hr. と両者の間に有意差は認められなかった(Fig. 5).

⑥ 関節液 collagenase 活性と RA テストとの関係

リウマチ因子の有無と関節液 collagenase 活性との関係を見る為に, RAテスト(-)~(±)群と RA テスト(+)以上群の2群について, 各々の関節液 collagenase 活性を比較した。RAテスト(-)~(±)群の平均値 (M±SE) は 342.6 ± 45.6cpm/ml. hr, RA テスト(+)以上群の平均値 (M±SE) は326.9 ± 50.3cpm/ml. hr と両者の間に有意な差は認められなかった(Fig. 6).

⑦ 関節液 collagenase 活性と血清 γグロブリン値との関係

RA 患者にしばしば高γグロブリン血症を見るが, ある程度病勢との関連性も指摘されている。血清γグロブリン1.5g/dl以下群と1.6g/dl以上群の2群に分けて, 各々の関節液collagenase 活性を比較した。血清γグロブリン1.5g/dl以下群の平均値 (M±SE) は 411.0 ± 80.5

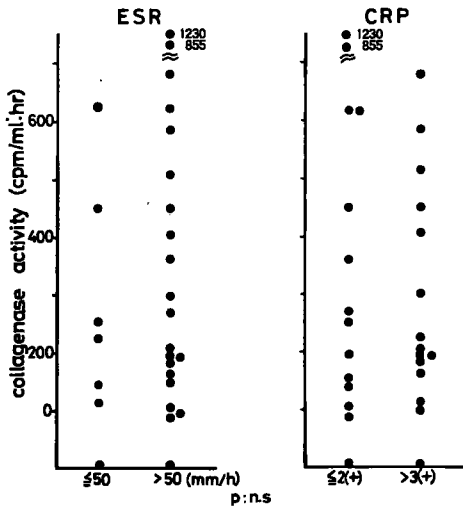


Fig. 4
Figs. 4 and 5. Collagenase activity in RA synovial fluids and laboratory finding.

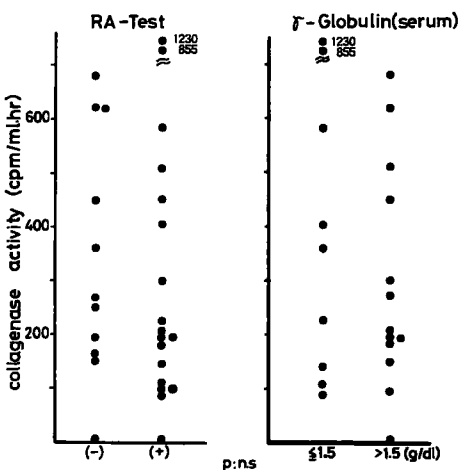


Fig. 6
Figs. 6 and 7. Collagen activity in RA synovial fluids and laboratory findings.

cpm/ml. hr., 1.5 g/dl以上群の平均値(M±SE)は 281.0 ± 34.6 cpm/ml. hr と両群の間に有意差は認められなかった(Fig. 7).

⑧ 関節液 collagenase 活性と関節液中白血球数との関係

関節液中白血球数は RA 患者関節液中に5000~数万個/mm³の単位で認められるが、その多少は関節局所の発赤、腫脹、疼痛等の局所の炎症

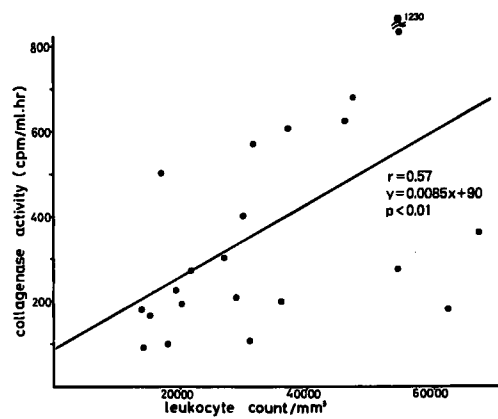


Fig. 8. Relationship between collagenase activity and Leukocyte count in RA synovial fluids.

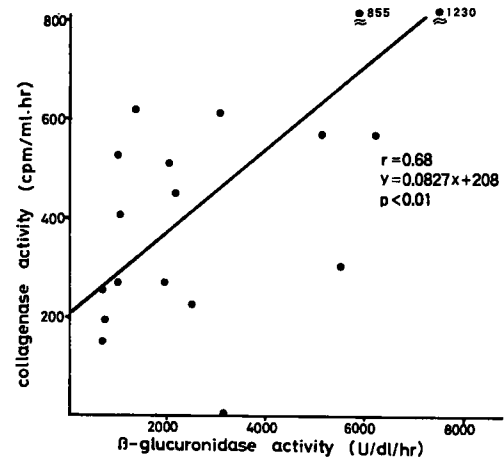


Fig. 9. Relationship of the activity between collagenase and beta glucuronidase in RA synovial fluids.

症状とかなりの相関関係を示すと言われている。関節液中白血球数と関節液 collagenase 活性との関係を検討した。両者の間に相関係数0.57で正の相関が認められ、関節液 collagenase 活性は、関節液中白血球数の多い症例程高値を示し、局所の炎症の程度との相関を示した(Fig. 8).

⑨ 関節液 collagenase 活性と関節液 β-glucuronidase 活性との関係

関節液中の β-glucuronidase 活性も関節局所の炎症の程度をよく反映する²³⁾と言われているが、両者の関係を検討すると、両者の間には相関係数0.68で正の相関が見られ、β-glucuroni-

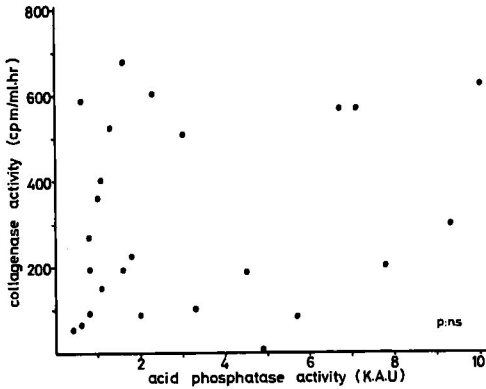


Fig. 10. Relationship of activity between collagenase and acid phosphatase in RA synovial fluids.

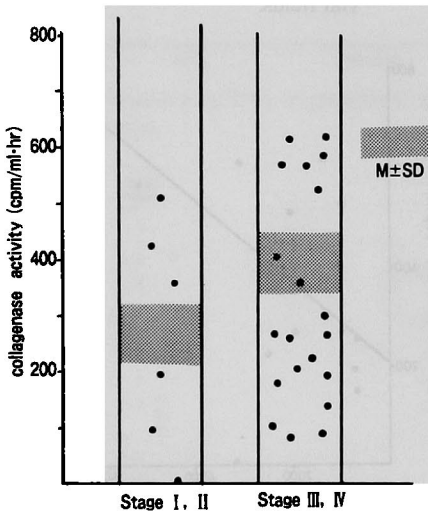


Fig. 11. Relationship between collagenase activities in RA synovial fluids and stage.

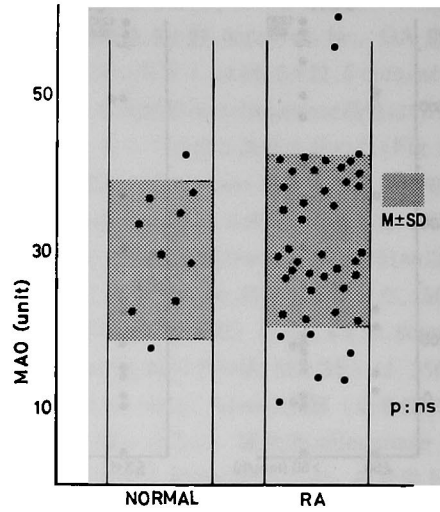
dase 活性の高い症例程, 関節液 collagenase 活性も高値を示すという結果が得られた (Fig. 9).

⑩ 関節液 collagenase 活性と関節液酸性 phosphatase 活性との関係

関節液酸性 phosphatase 活性も, 関節局所の炎症の程度を反映すると言われているが, 関節液 collagenase 活性との間には有意な関係は認められなかった (Fig. 10).

⑪ 関節液 collagenase 活性と, RA における骨破壊の程度 (Steinbrocker の分類²⁴⁾ による) との関係

関節液 collagenase 活性と RA 患者の骨破壊の程度との関係を検討した。RA 患者を骨破壊



F Fig. 12. Serum monoamine oxidase activity.

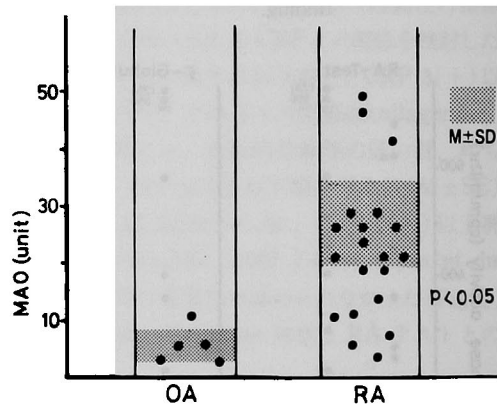


Fig. 13. Monoamine oxidase activities (MAO) in synovial fluids.

の軽度な stage I, II 群と, 骨破壊の高度な Stage III, IV 群の 2 群に分けて各々の関節液 collagenase 活性を比較した。stage I, II 群の平均値 (M±SE) は 268.8±53.5cpm/ml. hr. stage III, IV 群の平均値 (M±SE) は 388.5±41.9cpm/ml. hr. と両群の間に有意差は認められなかった (Fig. 11).

⑫ RA 患者と正常人との血清 MAO 活性の比較

正常人 10 例, RA 患者 43 例について血清 MAO 活性を測定すると, 正常人の平均値 (M±SD) は 28.7±10.0 単位, RA 例の平均値 (M±SD) は 31.3±10.9 単位と両者の間に有意差は認められず, RA 例 43 例中 2 例にのみ異常高値を認め

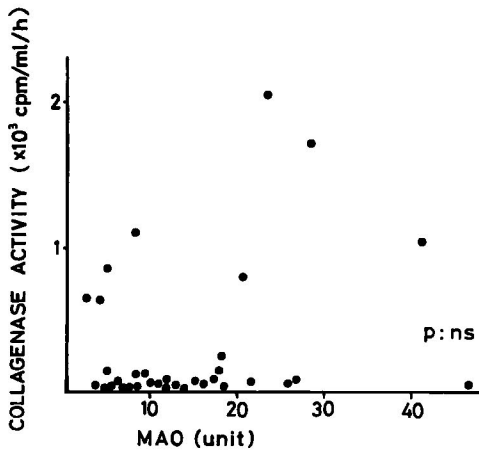


Fig. 14. Relationship between MAO and collagenase in RA synovial fluids.

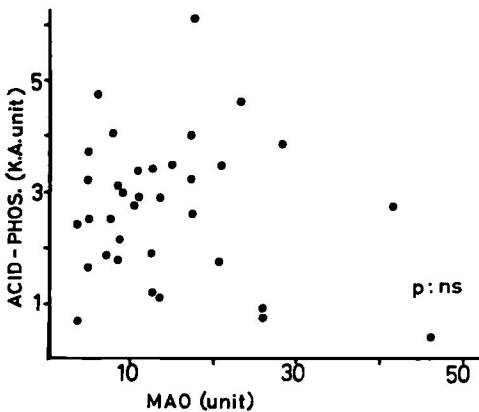


Fig. 15. Relationship between MAO and acid-phosphatase in RA synovial fluids.

た(Fig. 12).

⑬ 関節液 MAO 活性について、RA 患者と OA 患者の比較

RA 患者20例、正常 control として OA 患者5例について、細胞成分を除去した関節液中の MAO 活性を比較すると、RA 例の平均値(M±SD)は21.9±12.3単位、OA 例の平均値(M±SD)は5.1±3.1単位と、RA 例の方が OA 例に比して有意な高値を示した(Fig. 13).

⑭ 関節液 MAO 活性と関節液 collagenase 活性との関係

RA 患者34例について関節液 collagenase 活性(3M-KIで処理したもの)と MAO 活性との

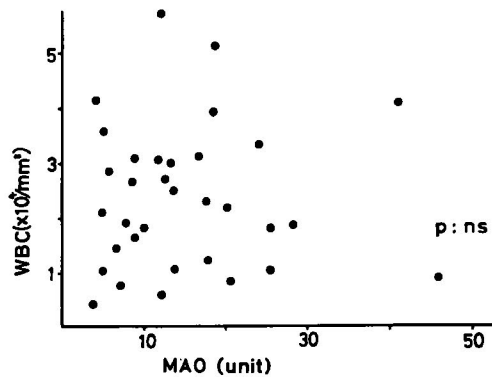


Fig. 16. Relationship between MAO and synovial leukocyte count.

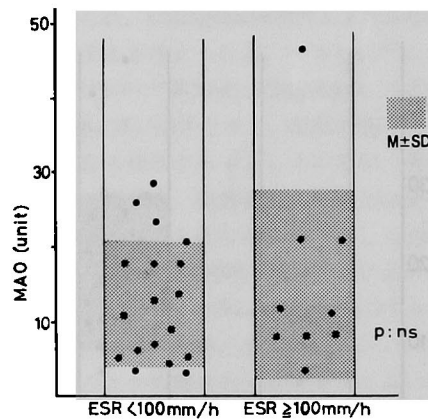


Fig. 17. Relationship between MAO and ESR.

関係を検討すると、両者の間に相関関係は認められなかった(Fig. 14).

⑮ 関節液 MAO 活性と、酸性 phosphatase 活性との関係

同様に RA 患者35名について、局所の炎症の程度を反映すると言われる酸性 phosphatase 活性と、MAO 活性との関係においても、両者の間に有意な関係は認められなかった(Fig. 15)

⑯ 関節液 MAO 活性と関節液中白血球数との関係

RA 患者33例について、これも関節局所の炎症の強さを反映すると言われる関節液中の白血球数と、MAO 活性との関係を図に示すが、両者の間に有意な関係は認められなかった(Fig. 16).

⑰ 関節液 MAO 活性と血沈との関係

今までの結果で関節液 MAO 活性は、関節局所の炎症の程度を反映するものとの相関関係の

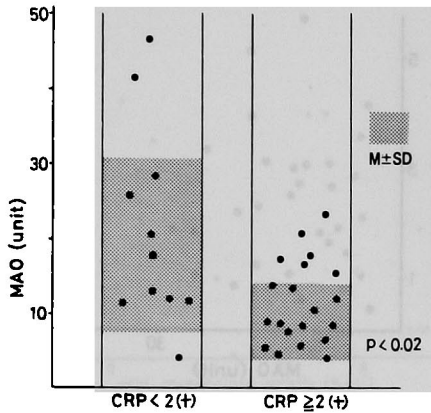


Fig. 18. Relationship between MAO and CRP.

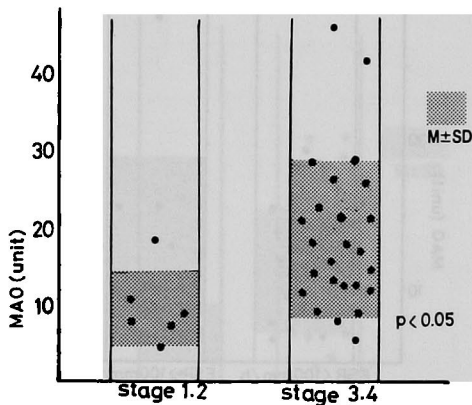


Fig. 19. Relationship between MAO and stage.

ないことを述べたが、ここでRAの全身性の活動性の強さを表わす血沈との関係を検討したが、血沈1時間値100mm未満例18例と100mm以上例9例の2群の間に有意な関係は認められなかった(Fig. 17).

⑱ 関節液 MAO 活性と CRP との関係

同様に、全身性の活動性を反映するCRPとの関係を検討した。RA患者31例をCRP2(+)未満群と、CRP2(+)またはそれ以上群の2群に分けて両者の平均値を比較した。CRP2(+)未満群11例の平均値(M±SD)は18.8±11.4単位、CRP2(+)以上群20例の平均値(M±SD)は9.8±5.0単位と、より炎症の程度の弱いCRP2(+)未満群の方に有意な高値を認めた。(Fig. 18).

⑲ 関節液 MAO 活性と stage との関係

RA患者の骨破壊の程度を表わすSteinblocker²⁴⁾によるstage分類と、関節液MAO活性との関係を検討した。RA患者31例を、骨破壊の軽度なstage I並びにII群と、骨破壊が進展したstage III並びに関節強直を有するstage IVの2群に分けて、各々のMAO活性を比較した。stage I, II群6例の平均値(M±SD)は9.4±4.6単位、stage III, IV群25例の平均値(M±SD)は19.1±9.8単位と、骨、関節破壊の進展が著明なstage III及びこれに骨性強直の加わったstage IV群の方に有意な高値を認めた(Fig. 19).

考 察

RAの炎症において主たる炎症の場は関節である。関節は骨、軟骨、滑膜より成り、それらの主な構成成分としてcollagenが知られている。collagenを特異的に分解する酵素であるcollagenaseが発見されて以来、RA炎症における他の酵素学的アプローチ同様にcollagenaseの関与が注目されて来た。collagenを生理的な条件下で分解できるのは、酸性領域のもとでのみ活性を有するcathepsin B₁²⁵⁾を除いてはこのcollagenaseのみである。collagenaseは不溶性collagenを、その各々のアミノ末端より1:3の所で特異的に切断し可溶性のcollagenに至らしむる。collagenase活性はRAにおいて滑膜培養¹⁴⁾、関節液²⁶⁾などにおいて活性が得られる。このことによりRAの関節炎症においてcollagenaseが何らかの要因として働いていることは確かである。従来collagenaseに関する研究は主に基礎的な分野が主であり、臨床的な研究は数少ない状態である。RAの末梢血白血球collagenaseと、正常人末梢血白血球collagenase活性を単位重量当りで比較した場合、有意にRAの方が高値を示した。これは塩化アンモン法による好中球の抽出率が80~90%²⁰⁾であることを考えると、各症例毎の白血球百分比をほぼ無視することが可能と思われ、RAにおいては、個々の白血球自体の活性が高まり、関節局所において炎症に関与していると考えられる。一方、RAの関節液collagenase活性と、正常controlとして用いたOA患者関節液collagenase活性との比較では、RAの方に有意な活性型collagenase

活性の高値を認めた。RA関節液においてはcollagenase活性は、血清より遊離した蛋白によって阻害され、活性型としてはあまり存在しないとされているが、著者の成績ではRA患者関節液においてかなりの活性型collagenase活性が検出され、またOA患者関節液にも低値ながらも活性を認めた。

collagenase inhibitorとしては関節液中の α_2 -macroglobulin, ある種の低分子inhibitor²⁷⁾が知られており、これらのinhibitorが阻害し切れないcollagenase活性が、関節液中に放出されている可能性も考えられる。Kojer²⁸⁾らはRA関節液中におけるcollagenaseの高値は、RA患者関節液中に多数認められる白血球collagenaseの活性化に起因するものであると考えている。また人白血球中にcollagenaseのproenzymeが見られ、これはRA関節液中のactivatorによってcollagenaseになる。そしてこのprocollagenaseはfree collagenaseの3倍に上ると言われている²⁹⁾。Sellers³⁰⁾らによるとlatentなcollagenaseはenzyme-inhibitor complexであると実証している。そしてこのようなlatent型として存在するcollagenaseをtrypsin, plasmin³¹⁾加うるに滑膜組織において増殖しているリンパ球などが活性化³²⁾してcollagenase活性を発揚し、滑膜、軟骨等の炎症を惹起して行くものと思われ、RAにおいてはcollagenaseの活性が発症に大きく関係していると考えられる。このような意味から、RAに対してcollagenase disease³³⁾という記載も見られる。また著者の結果ではOA関節液中にも低いながらcollagenase活性が認められた症例もあり、Ehrlich³⁴⁾の報告でもOA患者軟骨にもcollagenase活性が認められるとしており、collagenase活性はRAの発症に大きな要因でありながら、RA関節破壊に必ずしも特異的でないことをうかがわせている。関節液collagenase活性と、RAの全身性の活動性の指標とされている血沈、CRPなどとの間には有意な相関は認められなかった。またリウマチ因子、血清 γ -globulin値等との間にも相関は認められなかった。一方関節液collagenase活性と関節液中白血球数との間には正の相関が認められた。関節液中白血球数は、RA炎

症において局所の炎症の程度をよく反映すると言われており、このような事より関節液collagenase活性は関節局所の炎症に強い関係を持ち、その炎症の程度をよく反映し、血沈、CRP等と相関を示さないことより、全身的な関連性はあまりないと思われる。また、関節液collagenase活性が関節液中白血球数と相関すると言う事より、関節液collagenase活性の由来において、関節液中白血球が重要な因子を持つ可能性が考えられる。教室の成績によると、 β -glucuronidase, Cathepsin Dも局所の炎症の強さを反映するとされているが、著者の成績においても、collagenase活性と β -glucuronidase活性との間に相関が見られ、collagenase活性もまた炎症の程度を反映すると考えられる。一方石山³⁵⁾によると、RAにおいて関節液collagenase活性はstageの初期に高い活性を示し、変形の進んだ末期には低くなる傾向があるとしているが、著者の成績では、骨破壊、関節変形の程度(stage)との間に相関は認められなかった。もしcollagenase活性がRAの病初期において主に高い活性を示すのであれば、collagenase活性はRA炎症において、滑膜、軟骨の炎症促進に大いに貢献していることが想像され、逆に末期に高い活性を示すのであれば、RAにおいてcollagenase活性は炎症の処理、関節の線維化に役立つ酵素と考えられるが、その点は判然としない。RAの治療において有効である各種の薬剤はcollagenase活性を抑制することが知られている³⁶⁾が、となるとcollagenase活性は、RA炎症にとっては有害なものである可能性が強い。RAの発症、炎症の進展にとって、collagenase活性の高値(活性化という意味も含めて)が攻撃的に働く酵素であるということが言える。

一方MAO活性については、肝疾患¹⁵⁾をはじめ心疾患¹⁶⁾等において臓器の線維化を反映すると言われるMAO活性は、結合組織の代謝に大きな役割を果し、細胞外においてcollagenの架橋形成に関与する³⁷⁾。ところでAkeson³⁸⁾らによると拘縮関節において、関節囊のcollagenは対照に比して架橋結合が増加しているとし、この事はRAにおける病態、とりわけ関節の線維化にMAOが重要な役割を持つことは十分に予

想させるところである。そこで著者はRAの血清並びに関節液中のMAO活性を測定し、RAの炎症過程とMAO活性との関係を検討した結果、血清MAO活性については松本ら³⁹⁾の報告と同様、正常人とRA患者との間に差は認められず、関節液MAO活性はOA患者に比してRA患者は有意な高値を示した。この結果はRA患者の発症または経過において、関節液MAO活性が何らかの関連を有することを示唆し、またOA患者のMAO活性が極く低値に留まることより、RAとOAとの鑑別診断上においても有用であると思われる。RAの関節炎において関節液中白血球数、酸性phosphatase活性等は、局所の炎症程度を反映すると言われているが、これらと関節液中のMAO活性との間に相関関係が認められなかったことより、関節液MAO活性は関節局所の炎症程度を反映するものではないことがうかがわれる。また関節液中においてMAO活性値と白血球数が相関を示さなかったことより、関節液MAO活性は白血球のみに由来するものではないと考えられる。ところでRA炎症を全身性に反映する血沈値と、関節液MAO活性とは相関を示さなかったが、CRPと関節液MAO活性との関係において、CRP 2(+)以上群に比して、CRP 2(+)未満群の方に高値を認め、かつstageとの関係において、stage I, II群に比して、stage III, IV群の方に高値を認めたことより次の事が考えられる。すなわちRAの関節炎の過程において、骨の破壊が高度になり、関節の骨性強直が認められるような時期に関節液MAO活性は高値を示すようになるが、このような時期にはCRPはむしろ低値を示し、関節の炎症は関節の線維化という形をもって終局に近づくと考えられる。さて関節の強直の原因として五十嵐ら⁴⁰⁾はcollagenの全体量が変化するのではなく、collagenの架橋の増加によるものであるとしており、このcollagenの架橋に関与するのがMAOの一種であるlysyl-oxidaseであるとされている。このようにMAOはRAの関節炎において、関節の線維増殖、ひいては関節の拘縮、強直に重要な役割を持つことが示唆される。以上collagenaseは関節炎の発症、骨、関節破壊の進展において生体に攻撃的

に作用していると考えられるが、その一方ではMAOが炎症産物としての関節の線維化、遂には強直に大きく関与していると考えられる。関節を構築するcollagenにはいくつかのtypeがあるが、その各々のtype別に作用するcollagenaseの測定が今後可能になれば、RAの関節炎におけるcollagenaseの役割は、なお明らかにされていくであろう。

結 論

- (1)末梢血白血球collagenase活性について、RA患者と正常人で比較すると、RA患者に高値を認めた。
 - (2)関節液collagenase活性をRA患者とOA患者で比較すると、RA患者に高値を認めた。
 - (3)RA患者関節液collagenase活性は血沈、C-RP、リウマチ因子、血清 γ globulin値との有意な関係は認められなかった。
 - (4)RA患者において、関節液collagenase活性は関節液白血球数と正の相関を示した。
 - (5)RA患者関節液において、collagenase活性は β -glucuronidase活性と正の相関を示したが、酸性phosphatase活性とは相関を示さなかった。
 - (6)RA患者関節液collagenase活性は、骨破壊の程度(stage)との有意な関係は示さなかった。
 - (7)血清MAO活性について、RA患者と正常人で比較すると、両者の間に有意差は認められなかった。
 - (8)関節液MAO活性について、RA患者とOA患者を比較すると、RA患者の方に高値を認めた。
 - (9)RA患者関節液において、MAO活性とcollagenase活性ならびに酸性phosphatase活性との間に相関は認められなかった。
 - (10)RA患者関節液において、MAO活性と白血球数との間に相関は認められなかった。
 - (11)RA患者関節液MAO活性と血沈値との間に相関は認められなかった。
 - (12)RA患者関節液MAO活性は、CRP 2(+)以上群に比して、CRP 2(+)未満群の方に高値を認め、またstageとの関係において、stage I, II群に比してstage III, IV群の方に高値を認めた。
- 以上まとめると、関節液collagenase活性はOA患者に比してRA患者の方に有意な高値を認

め、関節液白血球数、 β -glucuronidase 活性などの関節局所の炎症の強さを表わす因子とよく相関を示した。MAO 活性もまた RA 患者関節液中に高値を示し、炎症の程度が弱く、骨破壊、関節の線維化の進行した症例に高値を認めた。このことより collagenase 活性と MAO 活性は、RA 炎症の発症、進展において、結合組織の代謝

という面から重要な役割を演じていると思われる。

本研究の遂行に当り、御指導ならびに御校閲を賜りました恩師大藤眞教授、ならびに山本伸郎博士、寺戸国昭博士に深謝致します。また直接御指導下さいました江沢英光講師をはじめ、教室員各位に感謝致します。

文 献

1. Kang, A.H., Nagai, Y., Piez, K.A. and Gross, J.: Studies on the structure of collagen utilizing a collagenolytic enzyme from tadpole. *Biochemistry* 5, 509—515, 1966.
2. Gross, J. and Lapiere, C.M.: Collagenolytic activity in amphibian tissues: A tissue culture assay. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 48, 1014—1022, 1962.
3. Mandl, I.: Collagenase and elastase. *Adv. Enzym* 23, 163—264, 1961.
4. Robertson, P.B., Ryel, R.B., Taylor, R.E., Shyu, K.V. and Fullmer, H.M.: Localization in polymorphonuclear leucocyte granules in rabbit. *Science* 177, 64—65, 1972.
5. Jeffrey, J.J. and Gross, J.: Collagenase from rat uterus. Isolation and partial characterization. *Biochemistry* 9, 268—273, 1970.
6. Lubec, G.: Collagenase activity of rat kidney with glomerulonephritis during the heterologous phase. *Clin. Chim. Acta.* 76, 89—94, 1977.
7. Fujiwara, K., Sakai, T., Oda, T. and Igarashi, S.: The presence of collagenase in Kupffer cells of the rat liver. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 54, 531—537, 1973.
8. 宇宿源太郎, 小山田郁子, 上田みち子, 本谷益良: ヒトの胃および兔皮膚創傷治癒時のコラゲナーゼ活性. 日本医師会雑誌, 68, 585—588, 1972.
9. Anderson, R.E., Kuns, M.D. and Dresden, M.H.: Collagenase activity in alkali-burned cornea. *Ann. Ophthalmol.* 3, 619—621, 1971.
10. Bautner, E.H., Triftshausen, C. and Hazen, S.P.: Collagenase activity of gingival tissue from patients with periodontal disease. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 121, 1082—1085, 1966.
11. Dresden, M.H., Heilman, S.A. and Schmidt, J.D.: Collagenolytic Enzymes in human neoplasms. *Cancer Res.* 32, 993—996, 1972.
12. Eisen, A.Z., Jeffrey, J.J. and Gross, J.: Human skin collagenase. Isolation and mechanism of attack on the collagen molecule. *Biochim. Biophys. Acta.* 151, 637—645, 1968.
13. Donoff, R.B., McLennan, J.E. and Grillo, H.C.: Preparation and properties of collagenases from epithelium and mesenchyme of healing mammalian wounds. *Biochim. Biophys. Acta.* 227, 639—653, 1971.
14. Evanson, J.M., Jeffrey, J.J. and Krane, S.M.: Human collagenase. Identification and characterization of an enzyme from rheumatoid synovium in culture. *Science* 158, 499—502, 1967.
15. Ito, K., Nakagawa, J., Minakuchi, C. and Fukase, M.: A clinical evaluation of serum monoamine oxidase with special reference to hepatic fibrosis. *Digestion* 4, 49—58, 1971.
16. 永尾 隆, 水沼良幸, 武市 脩, 伊東 進, 露口直彦, 森 博愛: 心筋硬塞症のモノアミン・オキシダーゼ活性. 日本医事新報, 2683, 24—26, 1975.
17. McEwen, C.M., Sasaki, G. and Jones, D.C.: Human liver mitochondrial monoamine oxidase. II.

- Determination of substrate and inhibitor specificities. *Biochemistry* 8, 3952—3962, 1969.
18. Nagai, Y. and Hori, H.: Entrapment of collagen in a polyacrilamide matrix and its application in the purification of animal collagenase. *Biochim. Biophys. Acta.* 263, 564—573, 1972.
 19. Nagai, Y., Lapiere, C.M. and Gross, J.: Tadpole collagenase. Preparation and purification. *Biochemistry* 5, 3123—3130, 1966.
 20. 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.
 21. Terato, K., Nagai, Y., Kawanishi, K. and Yamamoto, S.: A rapid assay method of collagenase activity using ^{14}C -labeled soluble collagen as substrate. *Biochim. Biophys. Acta.* 445, 753—762, 1976.
 22. Bray, G.A.: A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solution in a liquid scintillation counter. *Anal. Biochem.* 1, 279—285, 1960.
 23. 大藤 真, 江沢英光: RA の発症機序をめぐって—ライソゾームの立場から— 臨床医 1, 1603—1605, 1975.
 24. Steinbrocker, O., Traeger, C.H. and Batterman, R.C.: Therapeutic criteria in rheumatoid arthritis. *J. Am. Med. Assoc. (J.A.M.A.)* 140, 659—662, 1949.
 25. Burleigh, M.C., Barret, A.J. and Lazarus, G.S.: Cathepsin B₁: A lysosomal enzyme that degrades native collagen. *Biochem. J.* 137, 387—398, 1974.
 26. Harris, E.D., Jr. DiBona, D.R. and Krane, S.M.: Collagenase in human synovial fluid. *J. Clin. Invest.* 48, 2104—2113, 1969.
 27. Nagai, Y., Hori, H., Kawamoto, T. and Komiya, M.: A regulation mechanism of collagenase activity *in vitro* and *in vivo*. In *Dynamics of Connective Tissue Macromolecules*, North-Holland Publishing Company, pp. 172—182,
 28. Kojer, M. 第14回国際リウマチ学会(サンフランシスコ), 1977, 口演.
 29. Kruze, D. and Wojtecka, E.: Activation of leucocyte collagenase proenzyme by rheumatoid synovial fluid. *Biochim Biophys. Acta* 285, 436—446, 1972.
 30. Sellers, A., Cartwright, E., Murphy, G. and Reynolds, J.J.: Evidence that latent collagenases are enzyme-inhibitor complexes. *Biochem. J.* 163, 303—307, 1977.
 31. Werb, Z., Mainardi, C.L., Vater, C.A. and Harris, E.D. Jr.: Endogenous activation of latent collagenase by rheumatoid synovial cells. Evidence for a role of plasminogen activator. *N. Engl. J. Med.* 296, 1017—1023, 1977.
 32. Dayer, J.M., Russell, R.G.G. and Krane, S.M.: Collagenase production by rheumatoid synovial cells: Stimulation by a human lymphocyte factor. *Science* 195, 181—183, 1977.
 33. Cathcart, E.S.: Rheumatoid arthritis-A "Collagenase disease"? *N. Engl. J. Med.* 296, 1058—1059, 1977.
 34. Ehrlich, M.G., Mankin H.J., Jones, H., Wright, R., Crispin, C. and Vigliani, G.: Collagenase and collagenase inhibitors in osteoarthritic and normal human cartilage. *J. Clin Invest.* 59, 226—233, 1977.
 35. 石山嘉宣: 関節液コラゲナーゼからみた慢性関節リウマチおよび変形性関節症の病態. お茶の水医学会雑誌 23, 195—208, 1976.
 36. WoJtecka-Lukasik, E. and Dancewicz: Inhibition of human leucocyte collagenase by some drugs used in the therapy of rheumatic diseases. *Biochem. Pharmacol.* 23, 2077—2081, 1974.
 37. 伊藤憲一, 中野 博, 星加博司, 山本泰朗: 血清モノアミン・オキシダーゼ(MAO)—その数値をどう読むか—, 日本臨床, 31, 1851—1861, 1973.
 38. Akeson, W.H., Amiel, D., Mechanic, G.L., Woo, S. L-CY., Harwood, F.L. and Hamer, M.L.: Collagen

cross-linking alterations in joint contractures: Changes in the reducible cross-linkings in periarticular connective tissue collagen after nine weeks of immobilization. *Conn. Tissue Res.* 5, 15—19, 1977.

39. 松本美富士, 滝川清治: 膠原病におけるモノアミノキシダーゼ活性測定の臨床的意義, 日内会誌, 66, 388—394, 1977.
40. 五十嵐二都男: 関節の線維増生 内科, 41, 787—791, 1978.

Enzymological studies on rheumatoid arthritis.

1. Studies on collagenase and monoamine-oxidase activities in patients with rheumatoid arthritis

Shunsuke TODA

Third Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School

(Director: Prof. T. Ofuji)

We assayed the activities of collagenase and monoamine-oxidase (MAO) in the fluid of the patients with rheumatoid arthritis (RA) and examined the relationship between collagenase, MAO activities and the grade of joint inflammation. The mean collagenase value of RA patients was significantly higher than that of osteoarthritis (OA) patients. A significant positive correlation was present between collagenase activity, leukocyte counts, and beta-glucuronidase activity in RA synovial fluid. These indices are considered to be parameters of the grade of joint inflammation. There was no correlation between collagenase activity, erythrocyte sedimentation rate (ESR), gamma-globulin level, C-reactive protein (CRP), rheumatoid factor, acid-phosphatase activity and the stage of RA (grade of joint destruction). The mean MAO value of RA synovial fluid was significantly higher than that of OA synovial fluid. The mean activity of the group of patients whose CRP values were below two positive was significantly higher than that of the group of patients whose CRP values were over two positive. The mean MAO activity in stage 3 or 4 group was significantly higher than that in stage 1 or 2. These findings suggest that collagenase activity is intimately correlated with the grade of local inflammation in RA and that the MAO activity is closely correlated with the grade of joint fibrosis.