

慢性関節リウマチにおける酵素学的研究

第 2 編

慢性関節リウマチの経過とコラゲナーゼ活性

岡山大学医学部第三内科教室（主任：大藤 眞教授）

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

諸 言

collagenase活性は生体の各種組織（皮膚¹⁾，子宮²⁾，滑膜³⁾，白血球⁴⁾，癌組織⁵⁾）に存在し，生体の支持組織である collagen の代謝（分解・吸収）に関与しているが，その中で今回特に慢性関節リウマチ（以下 RA と略す）患者の末梢白血球，関節液について collagenase 活性を測定し，変形性関節症（以下 OA と略す）患者と比較し，RA については，CRP，RAテスト，血沈，関節液白血球数，酸性 phosphatase 活性などとの関連性を検討し，その結果より collagenase 活性が RA の炎症において急性炎症（炎症の活動性の強い）の時期に高活性値を示し，滑膜炎，軟骨，骨破壊を主とする RA の炎症の過程に大きな役割を演じていることが推察された。そこで本編においては，RA の個々の症例において経時的に関節液を採取して，その個々の症例，時期において活性型ならびに非活性型 collagenase 活性を測定し，その値がどのような変動を示すか，またその collagenase 活性値の変動と血沈，CRP，RA テスト，関節液白血球数，酸性 phosphatase 活性値とどのような関係を示すかを検討した。これらの研究により RA 炎症における collagenase 活性の役割はより明らかになっていくものと考えられる。RA の炎症は滑膜に始まり，しだいに軟骨，骨へと波及していき遂には骨関節の変形，強直を残す。このような type で一つの炎症のパターンは行なわれ

ていくが，collagenase 活性はどの段階で強い活性を発揮するのか，またどのように発症に関与するのか，また急性期に主に役割を果たすのか，それとも線維化の進む治癒期になり作用するのか，このような事は未だ明らかでない。病初期に強い活性を表わすのであれば，炎症の発症として作用するものであろうし，RA 炎症の急性期，進展期に強い活性を表わすとすれば，強い collagen の融解作用の故に主に組織障害性に働くものであろう。また治癒期（炎症の終末である骨関節の変形，強直の時期）に高い活性を示すのであれば，RA の炎症の発症，組織障害性に作用するのではなく，治癒機転，線維化に関連するものであり，いわば炎症の後始末をする酵素であろう。このような事を検討するためには，本来であれば RA の発症より数年から数十年の観察が必要となるのであろうが，著者が成し得たのは数ヵ月間の collagenase 活性の測定である。RA 炎症の過程から見れば非常に短い期間であるが，一応これらの成績は collagenase 活性の役割を知る上に役立つものと思われる。

対 象

対象は岡山大学医学部付属病院リウマチ外来に通院，または入院中の RA 患者12名と OA 患者1名である。RA 患者はアメリカリウマチ協会の診断基準において classical，または definite の患者である。Steinbrocker の分類においては stage II 2 名，stage III 3 名，stage IV 7 名

である。これらの計13名の患者について経時的に関節液を採取し、同時に随時末梢血も採取した。

方法および材料

① 検体の採取

上記患者について膝関節より無菌的に関節液を採取し、各種の測定に供した。

② 関節液白血球数の測定

患者より得られた関節液の10mlをとり、直ちに白血球用メランジュールを用いて白血球数を測定した。

③ 関節液酸性 phosphatase 活性の測定

患者より採取した関節液は白血球数測定后、直ちに1500 rpm で5分間遠沈し、上清について酸性 phosphatase 活性を測定した。

④ 関節液 collagenase 活性の測定

(a) collagenase 活性測定の基質

前編の如く、永井ら⁶⁾の方法により作成した0.2% ¹⁴C-glycine標識モルモット皮膚 collagen (1200cpm/mg) 溶液0.2mlを用いた。

(b) collagenase 活性の測定

寺戸⁷⁾らの方法により、¹⁴C 標識 collagen 溶液 (基質) 0.2mlに、各患者より得られた酵素溶液 0.1mlに0.1mlの0.05M Tris-NaCl-CaCl₂溶液を加え35℃で2時間反応させた后、反応停止の目的で20μlの80mM 0-phenanthroline溶液を加えた。反応停止后さらに35℃ 1時間 incubation し、室温に冷却した后0.4mlの dioxane を加え激しく攪拌した后に6000rpmで10分間遠沈し、残った未変性 collagen を沈澱させ、その上清 0.5ml を10mlの Bray 溶液に加え放射活性を測定し cpm/ml・hr を算出して collagenase 活性とした。

(c) 酵素溶液の調整

患者の膝関節より採取した関節液を直ちに1500rpm、5分間遠沈し、細胞成分などを除き、測定まで凍結保存した。測定に際しては関節液 0.1mlに0.1mlの0.05M Tris-NaCl-CaCl₂を加えたものを、活性型 collagenase 活性測定用の酵素溶液とした。非活性型 collagenase 活性の測定には、関節液を阿部⁸⁾らの方法に従い、3M NaI のかわりに3M KI 溶液で一昼夜透析したものを酵素溶液として使用した。

⑤ 個々の症例における関節液ならびに血液の経時的採取

当科外来ならびに入院中の RA 患者12名、OA 患者1名について、同一患者について3回から10回、数週の間隔をおいて採取し、同じ時期に血沈、CRP、RA テストの測定のために血液を採取し、collagenase 活性の動きとこれらの値の関係を検討した。

結 果

各患者における活性型ならびに非活性型 collagenase 活性と血沈、RA テスト、stage、関節液白血球数、酸性 phosphatase 活性の値を以下に述べる。

症例1. H.M. stage II. class 2.

活性型 collagenase 活性は各時期ともに、ごく弱い活性しか示さなかった。非活性型 collagenase 活性は全般的に高値を示し、RA テスト陽性、CRP、血沈などを見てもこの症例は高い活動性を有すると思われる。しかし非活性型 collagenase 活性は全身性の活動性を表わす CRP、血沈、ならびに局所的に炎症の強さを表わすと言われる関節液白血球数などの何らの関係を示さなかった(図1)。

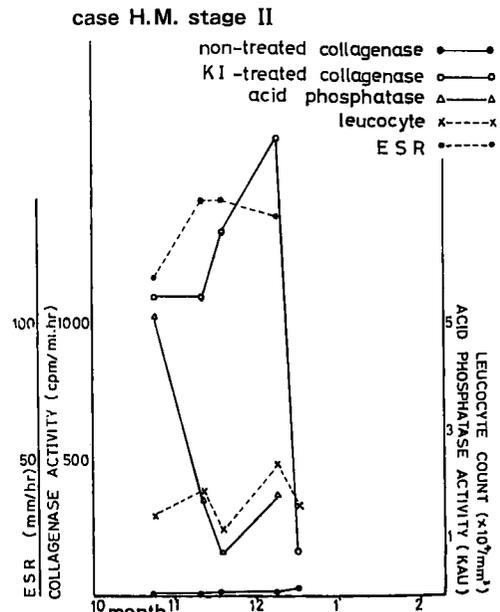


図1

症例 2. M.W. stage IV. class 1

この症例も活性型 collagenase 活性は全般的に著しい低値を見せ、ほとんど活性型 collagenase 活性としては無視できる範囲である。RA テスト(+)~(±), 血沈は70~80mm/h, CRP は3~4(+)とかなりの活動性を示すが、関節痛は軽度の膝関節痛を認めるのみである。非活性型 collagenase 活性は860cpm/ml·hr, 関節液白血球数は初回に21400/mm³ とかなりの高値を示し、時期が経つに従って11000/mm³, 10300/mm³, 5700/mm³のごとく回を追うごとに低値を示し6度目には1900/mm³の低値をとった。非活性型 collagenase 活性の動きは、ほぼこの動きに平行して低値を示す傾向が見られた。また酸性 phosphatase 活性も非活性型 collagenase 活性とはほぼ平行する変動を示した。この症例は初回検体採取時には CRP, 血沈, 関節液白血球数などよりかなりの活動性を示したが、非活性型 collagenase 活性などの動きとともに、関節液白血球数, 酸性 phosphatase 活性も低値を示し、同時に自覚症状も改善傾向を示し、実験終了時よりほとんど関節痛は認められなくなって現在に至っている(図2)。

症例 3. Y.M. stage IV. class 3.

この症例は、RA テスト(+), CRP 4~6(+), 血沈60~100mm/h, 多発関節痛, 関節腫脹も見られ、RA の活動性は高い。活性型 collagenase 活性は全般的に低値にとどまるが5度目の採取の時には975cpm/ml·hrを示し、非活性型 collagenase 活性の630cpm/ml·hrをしのいだ。また非活性型 collagenase 活性と関節液白血球数との関係を見ると、白血球数75200/mm³と最初は非常に高値を示し、はじめ2回の非活性型 collagenase 活性は1860cpm/ml·hr, 1710cpm/ml·hrと高値を示し、次回より関節液白血球数, 酸性 phosphatase 活性が減少するのにはほぼ平行して低値をとり、その他のCRP, 血沈などとは何らの関係を見い出せなかった(図3)。

症例 4. M.K. stage IV. class 3.

本例も血沈は100mm/h 前後, CRP 2~5(+) RA テスト 2(+), 全身性の多発関節痛, 関節腫脹が強く活動性が高い症例である。活性型 collagenase 活性は全般的にごく低値にとどまる

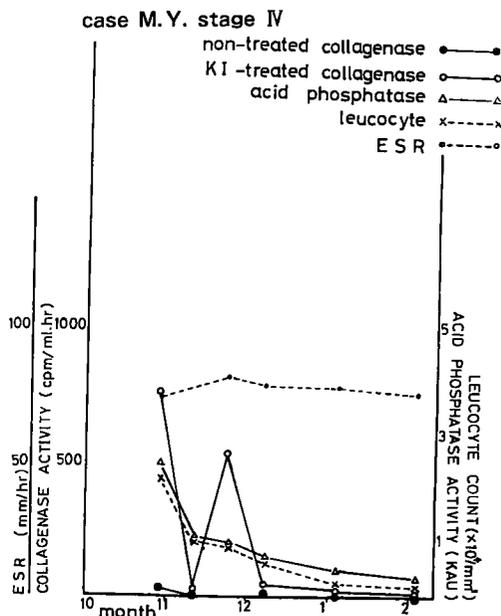


図 2

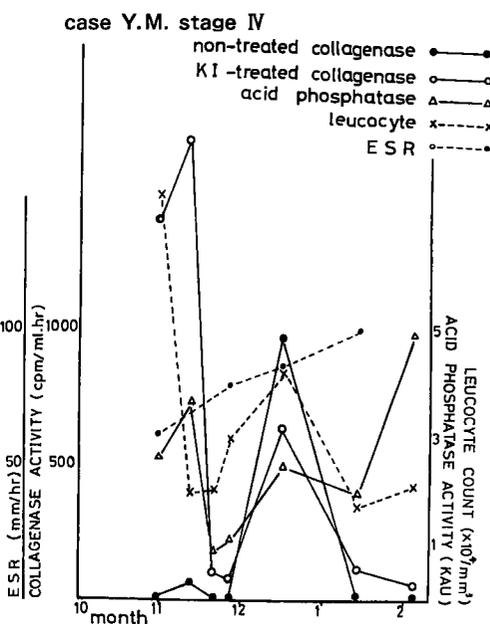


図 3

が、非活性型 collagenase 活性も一度 790cpm/ml·hr を示すが全般的にあまり高値を示さず、関節液白血球数, 酸性 phosphatase 活性などとも平行関係を見い出せなかった。全身的には高い

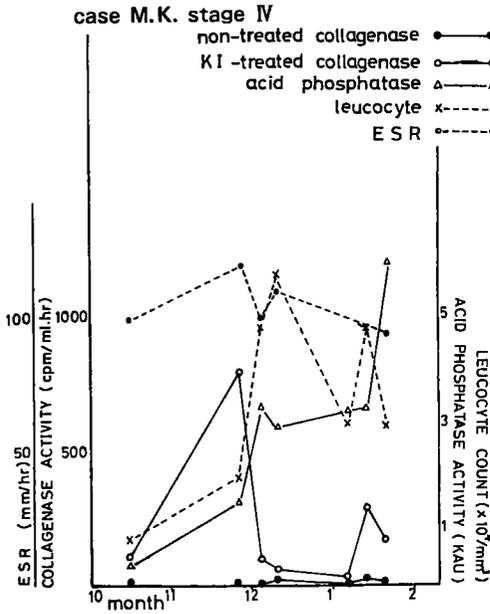


図 4

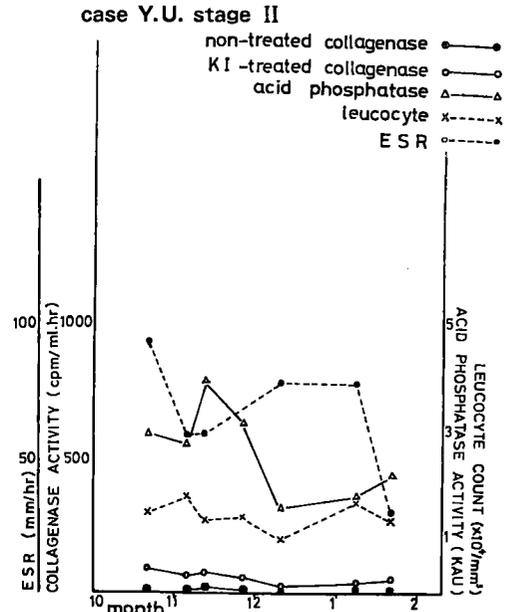


図 5

活動性を有するが collagenase 活性は概して低値を示し、他の因子ともあまり関係を見い出せない症例である(図 4)。

症例 5. Y.U. stage II. class 2.

本例は、RA テスト(-)、血沈は 28~95mm/h, CRP 3~5(+) と全身的には中等度の活動性を示し、両膝関節痛をはじめとして全身の多発関節痛はかなり強い。それに反して collagenase 活性は活性型、非活性型ともにごく低値を示すにすぎない。関節液白血球数も 10000~20000/mm³ の間にあり、RA としては著明に多い方ではなく、collagenase 活性と平行関係は見い出せないが両者ともに低値を示す。全身性の活動性に比較して局所の炎症を反映する因子は高値を示さない症例である(図 5)。

症例 6. M.A. OA.

本例は唯一の OA 患者であり collagenase 活性は活性型、非活性型とも無視できる範囲である(図 6)。

症例 7. A.I. stage IV. class 2.

RA テスト(+), 血沈 85mm/h, CRP 5(+) と活動性の高い症例であるが、非活性型 collagenase 活性は 490cpm/ml.hr とかなりの活性を示

case M.A. OA

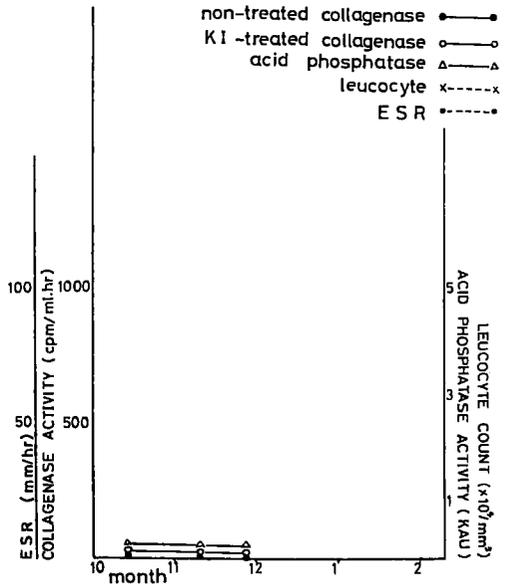


図 6

す。活性型 collagenase 活性は 0~30cpm/ml.hr と低値であり、かつあまり変動を示さない。酸性 phosphatase 活性は初回に 3.7 単位を示し、次回に非活性型 collagenase 活性が 30cpm/ml.hr と低値を示した際に酸性 phosphatase 活性

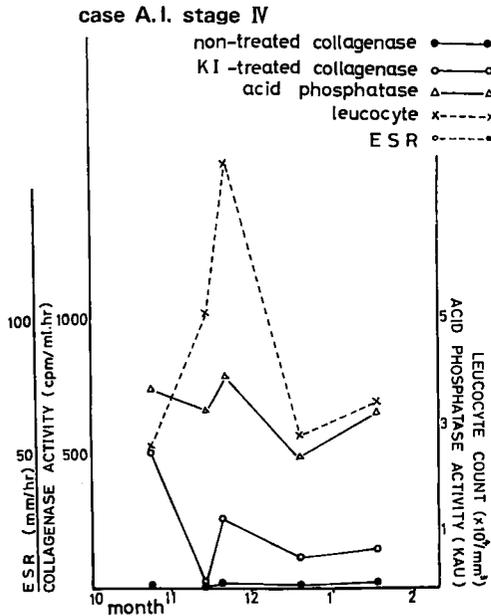


図 7

も3.2単位と低下し、非活性型 collagenase 活性の変動と平行して動く傾向が認められた。関節液白血球数は常に高値を示すが、collagenase 活性との関係は認められなかった(図7)。

症例 8. H.U. stage IV. class 2.

本例は、RA テスト(+), 血沈は88mm/h、と中等度の亢進を見るが、関節液白血球数は4950~10700/mm³と RA としては少ない部類である。また酸性 phosphatase 活性も0.8、2.0単位と低値であった。collagenase 活性については活性型、非活性型ともに低値を示し、どの値も目立った変動を示さない。3回しか検体採取ができず各測定値上の関係は何とも言えないが、stage も IV で局所の炎症はむしろ寛解機転に向っていると思われ、collagenase 活性もごく低値を示したに過ぎない(図8)。

症例 9. M.O. stage IV. class 2.

この症例は、RA テスト(+), 血沈96mm/h, CRP 2~3(+), 多発関節痛、関節腫脹も認められ中等度の活動性を有する。活性型 collagenase 活性は5回ともに低値を示すが、非活性型 collagenase 活性は初回2110cpm/ml·hr と非常に高値を示し、2度目より低下し、以後100cpm/ml·hr

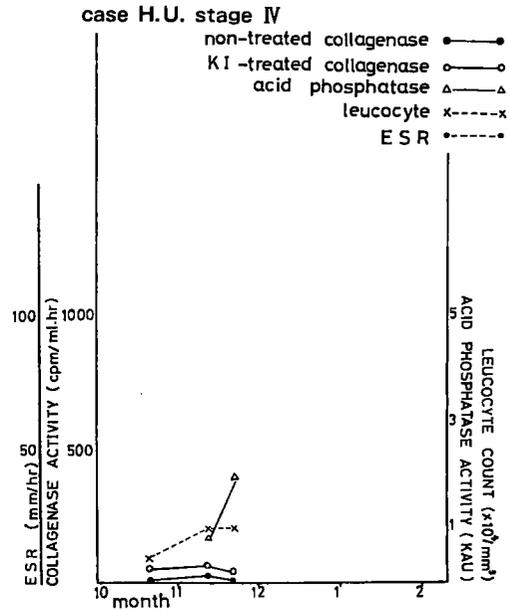


図 8

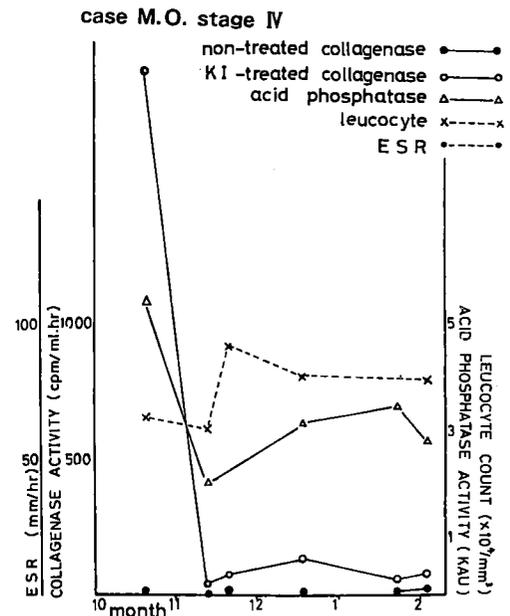


図 9

前後の値で横ばい状態を示した。この非活性型 collagenase 活性の動きは、初回に5.7単位を示し、次回より2.1単位と低下し、以後横ばい状態を示した酸性 phosphatase 活性の動きと平行関係を示した(図9)。

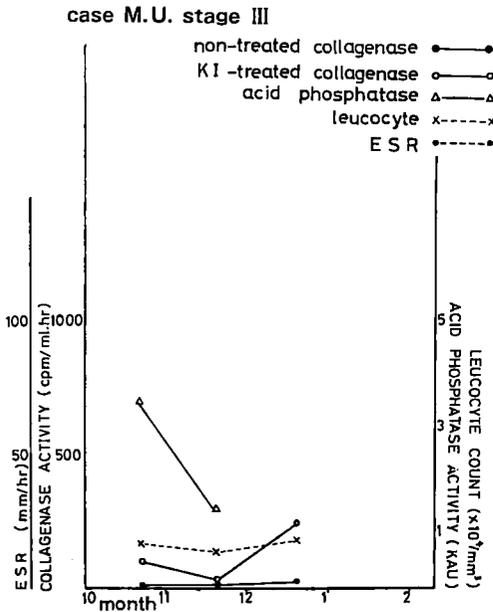


図10

症例10. M.U. stage III. class 1.

RAテスト(-), 血沈33mm/h, CRP(-), 関節痛は軽度で, 活動性は低い症例である。関節液白血球数も3回とも10000/ mm^3 以下で, 酸性phosphatase活性も低値を示し, 関節局所の活動性は各値からみて低いと思われる。collagenase活性は活性型に比して非活性型の方が高値を示すが, その両者ともに概して低値を示す。この症例も関節液collagenase活性は関節液白血球数と平行して動くと思われる(図10)。

症例11. S.M. stage III. class 2.

この症例は, RAテスト(-), 血沈22mm/h, CRP(-), 多発関節痛は中等度である。しかし関節液白血球数は初回32900/ mm^3 とかなり高値を示す。関節液collagenase活性は非活性型が初回2050cpm/ml·hrと高値を示し, 次回よりかなり低下する。2, 3回目は活性型と非活性型がほぼ同じ値を示す。この非活性型collagenase活性の動きは, 初回高値を示し以後低下した関節液白血球数と平行して動いた(図11)。

症例12. R.A. stage IV. class 1.

RAテスト(-), 血沈37mm/h, CRP(-), 関節痛も軽度と活動性の低い症例である。関節液白血球数は10000/ mm^3 程度で, あまり高値を示さない。酸性phosphatase活性も低値を示し, 局

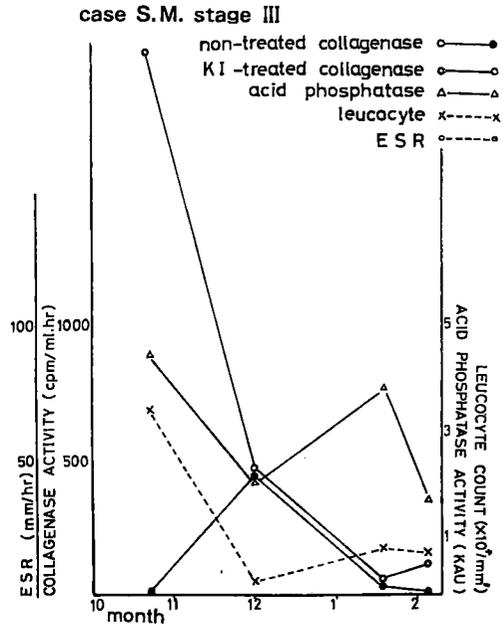


図11

case R.A. stage IV

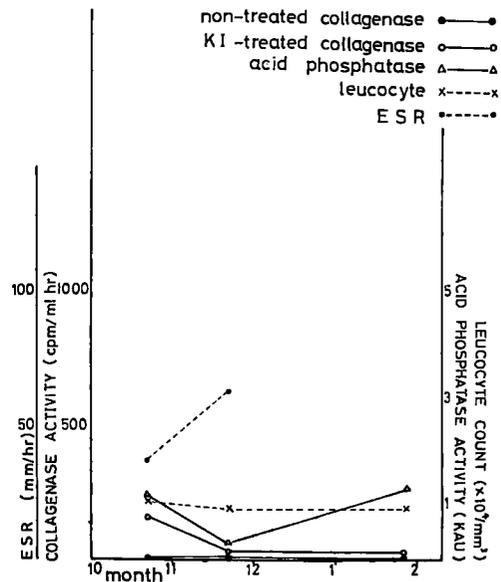


図12

所の活動性も高くないようである。collagenase活性も活性型は測定されず, 非活性型も3度ともに低値を示す。全ての値が低値を示した症例であるが, その意味では関節液collagenase活性は関節液白血球数, 酸性phosphatase活性と平行を示したと言える(図12)。

症例13. Y.N. stage III. class 2.

この症例は、RA テスト(+), 血沈88mm/h, CRP(+), 関節痛も中等度である。関節液白血球数は20000~60000/mm³と常に高値を示した。collagenase 活性は初回非活性型が1050cpm/ml·hr と高値を示したが、以後は低値を示し、酸性 phosphatase, 関節液白血球数などとの関係は見られなかった(図13)。

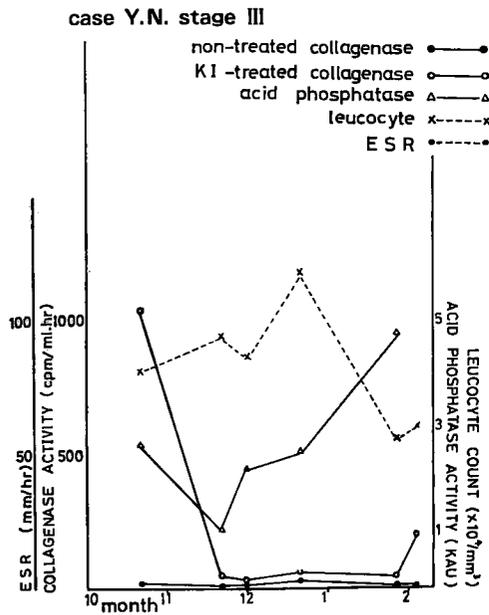


図13

考 察

RA 患者関節液中において collagenase 活性はほとんど非活性型として存在する⁹⁾とされているが、著者は前編において RA 関節液中において、かなりの collagenase 活性が活性型のままで存在し、またその活性が RA に特異的でなく、RA に比して低値ながらも OA 患者関節液中にも認められることを述べた。本編においては collagenase 活性は活性型と同時に 3 M-KI 処理後の非活性型 collagenase 活性を測定し、RA 患者各症例ごとに経時的に数回 collagenase 活性を測定し、それぞれの時点での他の検査所見との関連を検討し、RA 炎症経過中の collagenase 活性の推移を観察した。Lazarus¹⁰⁾らによると滑膜培養による RA ならびに非炎症性関節

疾患における collagenase 活性を測定しているが、それによると collagenase 活性は RA に特異的であり、またその活性は血沈、活動関節数、朝のこわばりの持続時間、Hematocrit 値などの全身的な factor と有意の相関があり病期、年齢などとは相関しないとしている。RA 患者関節液中の collagenase 活性を患者各症例ごとに経時的に測定した報告は見られないが、著者の検討の結果によると各症例によって様々な collagenase 活性の推移が見られ、また主に非活性型 collagenase 活性は他の関節液中の各因子、例えば関節液白血球数、酸性 phosphatase などとの相関関係を保ち変化するもの、またそれらと全く相関を持たずに変動するもの、またあまり変動の見られないものもあり、種々の変化の様式が認められた。今回経過を追えた RA の症例12例中で他の因子の何らかと平行して変化したと思われる症例は7例であった。関節液白血球数と平行して動いた症例は5例、酸性 phosphatase 活性と平行して動いた症例は5例、両者ともに平行して動いた症例は12例中3例であった。これら他の因子と平行関係を示したのは全て非活性型 collagenase 活性であって、活性型 collagenase 活性はほとんど低値を示すにとどまった。しかし中には第3症例のように、原因は明らかではないが経過中に、活性型 collagenase 活性が非活性型を上まわった症例もあった。これらの結果から見て RA 患者において、関節液 collagenase 活性は非活性型では個々の症例において経時的に測定すると、かなりの変動を示すものが多く見られ、またその変動は他の因子、例えば関節液白血球数や酸性 phosphatase 活性などと平行関係を示しながら変動する。これらの関節液白血球数や酸性 phosphatase 活性は関節局所において炎症の強さをよく反映するというより、やはりこの collagenase 活性は RA の炎症の経過において、組織障害に大きく関与していると考えられる。しかし著者が検体を採取し得たのは長くて数ヶ月の期間であって、RA の数年から数十年という長い経過に比してあまりにも短い故に明らかな事は言えないが、局所の炎症が強い時期には、前編で述べたごとく、この非活性型 collagenase 活性を、関節液中の

白血球¹¹⁾, トリプシン, プラミン¹²⁾, 加うるに滑膜組織において増殖しているリンパ球¹³⁾などが活性化して collagenase 活性をあらわし, 滑膜, 軟骨, 骨破壊の方向へと進展させていくものと思われる。

結 論

- (1)各症例において数回ずつ測定した関節液 collagenase活性は, 活性型は全経過を通じて低値を示し, 非活性型は活性型に比して高値を示し, かなりの変動を認めた。
- (2)OA 患者関節液 collagenase 活性は, 活性型, 非活性型ともにほとんど活性を見い出せなかった。
- (3)経過を追えた12例の RA 患者関節液 collagenase 活性について, 5例が他の因子とまったく関係なく変動し, 7例の患者の非活性型 collagenase 活性が関節液白血球数, 酸性phosphatase

活性などと平行して変動を示した。

(4)上記7例のうち, 関節液白血球数と平行して変動した症例は5例, 酸性 phosphatase活性と平行して変動した症例は5例, 両者とともに平行関係を示した症例は3例であった。

以上のごとく, 関節液 collagenase 活性は個々の RA 患者の経過中においても, 関節液白血球数, 酸性 phosphatase活性などと平行して変動し, RA の炎症の経過に密接に関係していると思われた。

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. 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.
2. Jeffrey, J.J. and Gross, J.: Collagenase from rat uterus. Isolation and partial characterization. *Biochemistry* 9, 268—273, 1970.
3. 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.
4. Robertson, P.B., Ryel, R.B., Taylor, R.E., Shyu, K.W. and Fullmer, H.M.: Localization in polymorphonuclear leucocyte granules in rabbit. *Science* 177, 64—65, 1972.
5. Dresden, M.H., Heilman, S.A. and Schmidt, J.D.: Collagenolytic enzymes in human neoplasm. *Cancer Res.* 32, 993—996, 1972.
6. 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.
7. Terato, K., Nagai, Y., Kawanishi, K. and Yamamoto, S.: A Rapid assay method of collagenase activity using ¹⁴C-labeled soluble collagen as substrate. *Biochim. Biophys. Acta.* 445, 753—762, 1976.
8. Abe, S., Shinmei, M. and Nagai, Y.: Synovial collagenase and Joint diseases: The significance of latent collagenase with special reference to rheumatoid arthritis. *J. Biochem. (Tokyo)* 73, 1007—1011, 1973.
9. Abe, S. and Nagai, Y.: Evidence for the presence of a latent form of collagenase in human rheumatoid synovial fluid. *J. Biochem.* 71, 919—922, 1972.
10. Lazarus, G.S., Decker, J.L., Cliver, C.H., Daniels, J.R., Multz, C.V. and Fullmer, H.M.: Collagenolytic activity of synovium in rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* 24, 914—919, 1968.
11. Kojer, M.: 第14回国際リウマチ学会 (サンフランシスコ), 1977, 口演。
12. Werb, Z., Mainard, 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.
13. Dayer, J.M., Russel, G.G. and Krane, S.M.: Collagenase production by rheumatoid synovial cells: Stimulation by a human lymphocyte factor. *Science* **195**, 181—183, 1977.

Enzymological studies on rheumatoid arthritis.**2. Relationship between collagenase activity and the clinical course of patients with rheumatoid arthritis****Shunsuke TODA****Third Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School****(Director: Prof. T. Ofuji)**

We examined the relationship between collagenase activity and the clinical course of the patients with rheumatoid arthritis (RA). The activity of active and inactive collagenase (treated by 3M-KI) was assayed several times for synovial fluid from twelve RA patients and one patient with osteoarthritis (OA). Rheumatoid factor, C-reactive protein (CRP), erythrocyte sedimentation rate (ESR), leukocyte counts and acid-phosphatase activity in the synovial fluid were measured simultaneously. In seven of twelve cases, the change of inactive collagenase activity was parallel by changes in synovial leukocyte counts or acid-phosphatase activity. In five of seven cases, the change in inactive collagenase activity was paralleled by acid-phosphatase activity and leukocyte counts. These findings suggest that collagenase activity is intimately correlated with the grade of local inflammation of RA and that the change of collagenase activity is closely correlated with the clinical course of RA patients.