RA 患者関節液および RA 血清因子による関節液好中球 および末梢血好中球の活性酸素遊離

轟木 峻・神宮政男・立川啓二・江崎一子・延永 正*

*Study on superoxide-generating activity in RA serum
and synovial fluid*

*Takashi Todoroki・Masao Shingu・Keiji Tatsukawa・
Ichiko Ezaki・Masashi Nobunaga**

関節炎における活性酸素の役割が近年注目 されてい
る¹⁻³⁾。慢性関節リウマチ (RA) の関節炎における 活性
酸素の病態的意義を検討するため、われわれは種々の 刺
激物による RA 関節液好中球 (SF・PMN) の super oxide
(O₂⁻) 産生と、RA 関節液 (RA・SF) 中の O₂⁻ 産生因
子、およびその臨床的意義につき検討した。

方法と対象

好中球分離は RA・SR および健常者末梢血より Boyum
の方法⁴⁾ にて分離、O₂⁻ の測定は 550 nm における cy-
tochrome C 還元反応により測定⁵⁾ した。SF はアメリカ
リウマチ協会診断基準による定型的ないし古典的 RA 17
例、変形性関節症 (OA) 19 例より無菌的に採取、3,000
回転にて遠沈後、上清を -80°C に保存、その補体を
CH₅₀ は Kent 法⁶⁾、C₃、C₄、C₅ は免疫拡散法、AH₅₀
はウサギ赤血球溶血法⁷⁾ にて測定した。また、immune
complex (IC) は 4% PEG⁸⁾ および、2.5% PEG 沈殿
蛋白の complement consumption (CC)⁸⁾ により測定し
た。また、関節液 0.15 ml を好中球 2.5×10⁶ 個と 5 分
間 4°C にて反応後洗浄、その好中球に cytochrome C
を加え、30 分間における還元量を測定した。

結 果

(1) RA・SF および 免疫反応刺激による SF・PMN の
O₂⁻ 産生および super oxide dismutase (SOD) による
抑制

熱変性 IgG 0.5 mg にて刺激した SF・PMN の O₂⁻
産生は 11.85 n mol であるのに対し、native IgG では
4.03 と低く、同様に 0.25 mg の serum-coated zymosan
による刺激では 77.01 n mol と非常に高く、uncoated
zymosan では 7.11 n mol であった。また、RA・SF に
て刺激した SF・PMN では 16.19±4.35 n mol であり、
これらはいずれも 2 ml 当たり 150 単位の SOD を添加
することにより、90%以上抑制されることより、O₂⁻ 依
存性であることがわかった (図 1)。

(2) SF・PMN を RA・SF および RA 血清にて刺激し
た O₂⁻ 産生の時間的経過

RA・SF、RA 血清ともに 10 分までは急激な反応を示す
が、その後の反応は緩徐であった。

stimulants	superoxide (nmol/2.5×10 ⁶ cells)
(1) aggregated IgG	~5
(2) (1)+SOD	~0.5
(3) native IgG	~2
(4) serum-coated zymosan	~80
(5) (4)+SOD	~1
(6) untreated zymosan	~5
(7) RA synovial fluid	~15
(8) (7)+SOD	~1

図 1 superoxide generation by synovial fluid
neutrophils stimulated with immune reactants
and the effects of superoxide dismutase (SOD)

図 2 superoxide generation by serum-or synovial
fluid-stimulated neutrophils isolated from per-
ipheral blood or sunovial fluids

(3) RA および OA・SF および RA 血清の O₂⁻ 産生
作用

図 2 に示すように、SF・PMN では RA 血清にて刺激
した場合 32.15±7.72 n mol であり、RA・SF 8.37±4.71
n mol にくらべて有意に高い O₂⁻ 産生がみられた。また、
OA・SF (0.84±1.68) にくらべて RA・SF では有意に高い
O₂⁻ 産生がみられた。

一方、健常者末梢血好中球 (NI・PMN) でも OA・SF
(1.92±1.42) にくらべて RA・SF (4.5±3.26) で有意に
高い O₂⁻ 産生がみられた。また、RA・SF による刺激

* Department of Internal Medicine, Institute of
Bioregulation, Kyushu University 九州大学生体防
御医学研究所内科

図3 Sephadex G-200 chromatographic elution profile of superoxide-generating activity of synovial fluid from patient with rheumatoid arthritis

図4 complements and immune complex levels of synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis statistical significance: * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$

では $\text{NI} \cdot \text{PMN}$ にくらべ $\text{RA} \cdot \text{PMN}$ にて有意に高い O_2^- 産生がみられた。

一方、 $\text{RA} \cdot \text{SF}$ の O_2^- 産生作用は SF の IC 値、総蛋白量および γ -globulin 値などといずれも相関傾向を示した。

(4) ゲル濾過による O_2^- 産生因子の検討

SF の O_2^- 産生因子を同定するため、 $\text{RA} \cdot \text{SF}$ を Sephadex G-200 にてゲル濾過し、3.36 ml ずつ分画後、凍結乾燥・濃縮および透析後、各分画の O_2^- 産生作用をみると、主に分子量48万よりやや高分子分画に O_2^- 産生刺激因子がみられ、アルブミンより小さい低分子分画にも軽度みられた (図3)。

(5) $\text{RA} \cdot \text{SF}$ および $\text{OA} \cdot \text{SF}$ の補体および IC

$\text{OA} \cdot \text{SF}$ にくらべ $\text{RA} \cdot \text{SF}$ では CH_{50} 、 C_3 、 C_4 、 AH_{50} いずれも有意に低値を示した。また IC は4% PEG, CC でみると $\text{OA} \cdot \text{SF}$ にくらべ $\text{RA} \cdot \text{SF}$ では有意に高値を示した (図4)。

考案と結語

$\text{RA} \cdot \text{SF}$ 中の O_2^- 産生因子は IC の測定結果とゲル濾過の結果とを併せ考えると、高分子のものは intermediate の IC であることが示唆される。また、低分子のものについては補体の fragment である可能性が考えられるが、さらに検討が必要と思われる。

以上の結果は、 O_2^- による軟骨の破壊やヒアルロン酸の解離などの報告と併せ、 RA の関節炎における O_2^- の病態作用を支持するものと思われる。

文 献

- McCord, J.M.: Free radicals and inflammation: protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science* 185 : 529-531, 1974.
- Greenwal, R.A., Moy, W.W., Lazarus, D.: Degradation of cartilage proteoglycans and collagen by superoxide radical. *Arthritis Rheum.* 19 : 799-805, 1976.
- Robert, A.G., Wai, W.M.: Inhibition of collagen gelation by action of the superoxide radical. *Arthritis Rheum.* 22 : 251-259, 1979.
- Boyum, A.: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *J. Clin. Invest.* 97 : 77-89, 1967.
- Goldstein, I.M., Roos, D., Kaplan, H.B.: Complement and immunoglobulin stimulate superoxide production by human leukocytes independently of phagocytosis. *J. Clin. Invest.* 56 : 1156-1163, 1975.
- Kent, J.F., Fife, E.H., Jr.: Precise standardization of reagents for complement fixation. *Am. J. Trop. Med.* 12 : 103-116, 1963.
- 中山秀美, 小出 輝, 田村 昇: Alternative pathway を介する補体活性の測定法. *臨床免疫* 10 : 505-509, 1978.
- 江崎一子, 酒井好古, 延永 正: 膠原病における可溶性免疫複合物の定量——ポリエチレングリコール沈殿蛋白量と補体消費能. *リウマチ* 21 : 375-384, 1981.