

関節疾患の関節液中トリプトファン代謝について

岩手医科大学整形外科科学教室（指導：猪狩忠教授）

生化学教室（指導：小原喜重郎教授）

土 沢 正 雄

〔原稿受付：昭和43年12月23日〕

Tryptophan Metabolism in the Synovial Fluid in Joint Diseases

by

MASAO TSUCHIZAWA

Dept. of Orthopedic Surgery, School of Medicine, Iwate Medical University, Morioka, Japan

(Director : Prof. TADASHI IGARI)

Dept. of Biochemistry, School of Medicine, Iwate Medical University, Morioka, Japan

(Director : Prof. KIJURO OBARA)

The author first found some green fluorescent substances in the concentrated synovial fluid by means of CRAMMERS and ascertained that a part of these was derived from tryptophan intermediates by paper chromatography.

In the present study, the author attempted to determine the tryptophan in blood and synovial fluid, and also the tryptophan intermediates in synovial fluid in order to classify the specificity of tryptophan metabolism in rheumatoid arthritis as an inflammatory disease and in osteoarthritis as a noninflammatory disease, respectively.

Concentrated synovial fluid was developed by means of descending paper chromatography. The fluorescent spots were noted under an ultraviolet light and the Rf values of the spots were determined. Spots of anthranilic acid, xanthurenic acid and 3-hydroxykynurenine derivate were found in both diseases, but d-kynurenine and l-kynurenine were found in rheumatoid arthritis only.

The tryptophan content was determined by using ultraviolet absorption spectra and was calculated by coefficient of molecular absorption of GOODWIN. The tryptophan content in the synovial fluid in rheumatoid arthritis was found to be increased as compared with that of osteoarthritis, but no change was found in the blood in rheumatoid arthritis, osteoarthritis and healthy subjects. No relation was found between the tryptophan contents in blood and the existence of joint hydrops in both diseases, and also between the tryptophan content in blood and synovial fluid and the stage in rheumatoid arthritis. On the other hand, there is a close relation between the tryptophan content in synovial fluid and the increased blood sedimentation rate in rheumatoid arthritis. These findings play an important role for the diagnosis of definite rheumatoid arthritis.

On the tryptophan intermediates in synovial fluid, the kynurenine content in rheumatoid arthritis was eight times more than that of osteoarthritis, and the anthranilic acid content in rheumatoid arthritis increased four times in comparison with that of osteoarthritis, while kynurenic acid and nicotinic acid contents in rheumatoid arthritis were about half of that of osteoarthritis, but no change was found xanthurenic acid in both diseases.

It appears that increased tryptophan and kynurenine in synovial fluid is due to the fall of tryptophan pathway by the decrease of enzymatic activity in synovial fluid in rheumatoid arthritis. It is suggested that there are different metabolic pathways between synovial fluid and blood, and that some factors, whether latent or manifest dysfunctions of liver and adrenals, cause the depression of the tryptophan metabolic activity in rheumatoid arthritis.

第一章 緒 言

Tryptophan (Try) は Hopkins および Cole (1901)¹⁾ によつて発見され、その代謝は indol 核を有するアミノ酸特有の複雑でかつ特異的な代謝 pattern を示すことが明らかになり、その結果近年に至るまでその代謝、栄養、生理作用、遺伝生化学および臨床医学などの多くの分野における研究が数多くみられるようになった。

特に臨床医学においては内分泌腺疾患²⁾³⁾、悪性腫瘍⁴⁾⁵⁾、熱性疾患⁶⁾⁷⁾、膠原病⁸⁾⁹⁾、ビタミン欠乏症¹⁰⁾¹¹⁾などに関する Try 中間代謝産物の尿中異常排泄に関する報告が多く見受けられるようになった。

関節リウマチ患者の Try に関する研究は、1958年に Herrman¹³⁾¹⁴⁾が関節疾患患者の関節液中の Try を定量することにより、各疾患の鑑別診断の指標になるかも知れないという着想から、赤沈との関係について研究した報告があり、炎症性および非炎症性疾患の鑑別には充分診断的価値があると述べている。

一方関節リウマチの病態を追究するための Try 代謝およびその中間代謝産物に関する報告は、1960年 Mc Millan¹⁵⁾が関節リウマチ患者においては、尿中 3-hydroxyanthranilic acid (3HAA) の増量を認めたと報告してから、Bett¹⁶⁾¹⁷⁾および Spiera¹⁸⁾¹⁹⁾²⁰⁾によりそれが確認されただけでなく、Bett¹⁶⁾は L-Try を負荷することにより関節リウマチ患者では尿中 Kynurenine(Kyn) の排泄が増加したと述べ、Spiera¹⁹⁾²⁰⁾、Flinn および Price²¹⁾は同様に L-Try を負荷することにより、Kyn および 3-HAA の排泄の増加を認めたと報告している。

著者は関節液中の Crammer 濃縮物の中に、緑色の蛍光物質の存在を認め、その一部が Try 中間代謝産物に由来することを paper chromatography (PPC) に

よつて確認した。そこで炎症性および非炎症性疾患を代表する関節リウマチと変形性関節症における血液および関節液中の Try、さらに関節液中における Try 中間代謝産物について測定し、若干の知見を得たので報告する。

第2章 実験材料および実験方法

第1節 実験材料

患者は岩手医科大学附属病院整形外科および関連病院整形外科で、臨床所見、X線所見および血清学的所見に基づき、アメリカリウマチ協会診断基準による definite rheumatoid arthritis, または classical rheumatoid arthritis に属する関節リウマチおよび膝関節の変形性関節症と診断されたもので、その患者の血液と関節液を実験に供した。血液は肘静脈より採取し、関節液はすべて膝関節より穿刺したものであり、それぞれ可及的速やかに実験に使用した。

第2節 実験方法

第1項 PPCによる関節液中蛍光物質の分離および確認諸反応

1) 関節液の前処置 (Crammer の濃縮法²²⁾)

関節液一定量を $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 飽和によつて除蛋白し、その濾液に Phenol 3 ml を加え、Phenol 層を分離後一定量の Ether および蒸留水 0.5 ml を加えよく攪拌し遠心分離すると、蛍光物質は濃縮され、この水滴を東洋濾紙 No. 51 に塗抹した。

2) 展開方法

Butanol 酢酸水 (Butanol : 氷酢酸 : 水 = 4 : 1 : 5) を展開溶媒として 8~10 時間室温で下降法により展開した。

3) 検出法

上記方法により展開した濾紙上の蛍光物質の確認に

は次のような方法を用いた。

(1) 紫外線下の蛍光観察およびRf値の測定。

(2) 分離した各蛍光 spot の確認には、Ninhydrin 反応、Ehrlich's Aldehyde 反応、純品の展開を行なった。

第2項 血中および関節液中のTry 定量²³⁾²⁴⁾

蛋白質は250~320m μ の間に Try と Tyrosine に起因する特有な吸収帯を有し、しかもTryとTyrosineのそれぞれの和として現われることが知られており、これら吸光度と波長に於ける分子吸光係数より、蛋白水溶液のまま両者を定量することが可能である。即ち試料(血液又は関節液) 1 ml をとり、それを0.1N-NaOHで正確に100 ml とし、血液の場合はさらにその1 ml を0.1N-NaOH で10倍に稀釈し、その4 ml を試料として、日立製分光光度計により、280.0 m μ および294.4 m μ の吸光度を測定し、Goodwin の分子吸光係数を乗じ既定の方法で算出した。

第3項 Kyn および Anthranilic acid の定量

Kyn と Anthranilic acid (AA) の分離は Brown および Price²⁵⁾ の方法により、定量は Walsh²⁶⁾ の方法にしたがつた。ただし前処置として関節液は蛋白質を多量に含有するため Ethanol-Acetone (1:1) 溶液を試料の約10倍量加えて、よく攪拌した。それを濾過後一定量に濃縮し、あらかじめ活性化されたカラム(Dowex 50(H⁺), 1 $\times$ 7cm) に吸着させた。これを0.1 N-HCl 80ml, 0.5N-HCl 100ml, 1.0N-HCl 100ml, 2.0N-HCl 100ml, 4.0N-HCl 100ml で抽出し、それぞれを fraction A, B, C, D, E とした。

fraction E には Kyn が含有されており、これを一定量に濃縮し、2倍量の Ehrlich 試薬(50%氷酢酸に1% p-dimethylaminobenzaldehyde を溶解)を加え10分後に日立製分光光度計により450m μ で比色定量した。またAAは fraction D に含有されており、同様に一定量に濃縮し、2倍量の Ehrlich 試薬を加え10分後に470 m μ で比色定量した。

第4項 Kynurenic acid および Xanthurenic acid の定量

Kynurenic acid (KA) および Xanthurenic acid (XA) の定量は Satoh, Price²⁷⁾ の方法によつた。試料(5 ml) を Ethanol-Acetone 溶液で除蛋白し、2時間攪拌後濾過し、一定量に濃縮した。それを蒸留水で120 ml とし、さらに1N-HCl 30 ml を加え、あらかじめ用意したカラム(Dowex 50(H⁺), 1 $\times$ 7 cm) に吸着させた。それを0.2N-HCl 50ml, 0.5N-HCl 100ml, 蒸留水20 ml の順に洗い、396 ml の蒸留水で抽出し、それに0.5

M-phosphate buffer (pH7.4) 4 ml を加え総量400 ml とした。

XAはその400ml より5 ml をとり0.005M-phosphate buffer (pH7.4) 1 ml を加え、さらに conc. H₂SO₄ 4 ml を加えて、Aminco-Bowman 分光蛍光光度計により、Fluorescence 435 m μ , Activating 340 m μ で測定した。

XA は 400 ml より5 ml をとり 0.005 M-phosphate buffer (pH7.4) 1 ml, さらに飽和 NaOH 4 ml を加えた後、Aminco-Bowman 分光蛍光光度計により Fluorescence 530 m μ , Activating 370 m μ で測定した。

第5項 Nicotinic acid の定量

Nicotinic acid (NA) の定量は八木²⁸⁾、川崎²⁹⁾の方法によつた。

試料3 ml に蒸留水1 ml を加え、さらに40%NaOH 1 ml を加え、100°C30分で加熱水解した。所定の時間後とり出し、冷却後蒸留水を加え一定量とした。さらに conc. HCl を加えて酸性として蛋白質を沈澱させた。それを遠心分離し、上清10ml に40%酢酸鉛2 ml と6%-Na₂HPO₄ 4 ml を加え、混和後遠心分離し上清液をとりpH 6 とし、BrCN 1 ml を加え30~60°Cにて5分間反応させ、冷却後室温で4%-aniline-alcohol 1 ml を加えて呈色させ、日立製分光光度計にて460m μ で測定した。

第3章 実験成績

第1節 PPCによる関節液中蛍光物質について

関節リウマチ および変形性関節症患者の関節液をPPCにより展開した結果、Fig. 1に示すように関節リウマチ患者の関節液では Rf 値、0.18, 0.35, 0.40, 0.56, 0.960 のところに蛍光物質を認め、また変形性関節症では0.86, 0.18, 0.55, 0.96のところに蛍光物質を認めた。それらを Rf 値、蛍光色調、Ninhydrin, Ehrlich および純品の展開により同定した。その結果 Table 1に示すようになり、関節リウマチと変形性関節症に共通してみられる物質はAA, XAおよび3-hydroxykynurenine derivateであり、d-kyn および l-kyn は関節リウマチのみに認められた。

第2節 血中および関節液中の Try 含量について

血中 Try 含量は Table 2, 3 および Fig. 2に示すように高値を示すものからあげると対照は平均281.1 $\pm$ 19.0mM/ml, 関節リウマチは平均272.4 $\pm$ 30.7mM/ml, 変形性関節症は平均261.8 $\pm$ 33.2mM/ml となるが、有意差は認められなかつた。一方関節液中の Try

Table 1 Color Reaction of Chromatogram of the Synovial Fluid in the Patient with Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis

fluorescence	bluish green	bluish green	bluish yellow	bluish yellow	green	bluish purple
Rf	0.086	0.18	0.35	0.40	0.56	0.96
Ninhydrin	+	+	+	+	-	+
Ehrlich aldehyde	+	+	+	+	+	+
Diagnosis	?	Glucuronide of 3-OH Kynurenin	D-Kynurenine	L-Kynurenine	Xanthurenic acid	Anthranilic acid

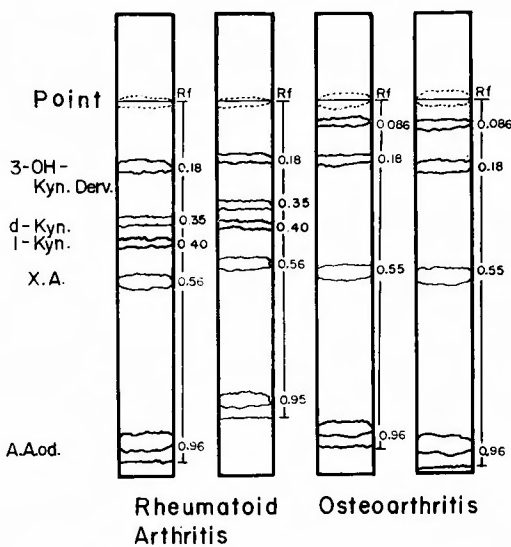


Fig. 1 Fluorescent Substance in the Synovial Fluid in the Patient with Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis Separated by Paperchromatography.

含量は関節リウマチが平均 20.38 ± 3.69 mM/ml, 変形性関節症は平均 12.67 ± 2.63 mM/mlであり, 変形性関節症に比較して関節リウマチがかなりの高値を示した。また両疾患の患者を関節水腫の有無により分類して, 血中の Try 含量を比較してみると Table 4 に示すように, 関節リウマチでは関節水腫を有するものは平均 273.0 ± 37.5 mM/mlであり, 関節水腫のないものは平均 271.8 ± 24.6 mM/mlであった。また変形性関節症では関節水腫を有するものは平均 259.7 ± 29.9 mM/mlであり, 関節水腫のないものは平均 259.8 ± 35.5 mM/mlであり, 対照例は平均 281.1 ± 19.0 mM/mlでありいずれも有意差を認めなかった。

また両疾患の関節液中 Try 含量と赤沈との関係については Fig. 3 に示すように変形性関節症の全例は Try 値が 18 mM/ml 以下であり, 赤沈は 55 mm/時間以

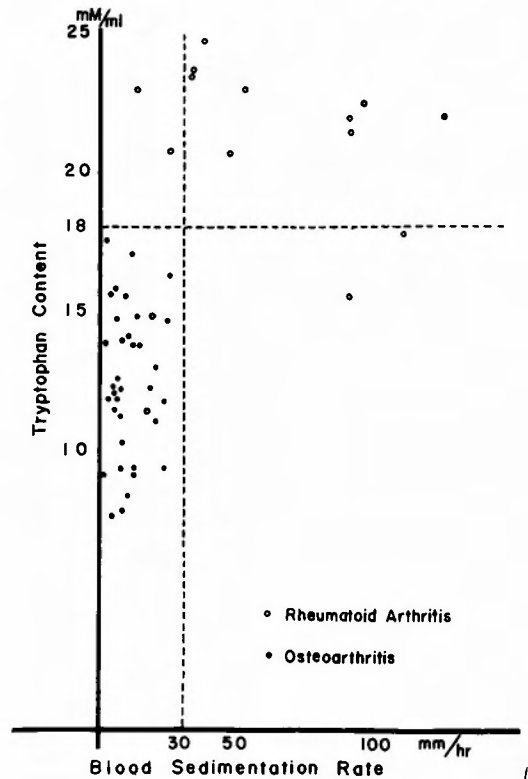


Fig. 2 Relationship between Tryptophan Content in the Synovial Fluid and Blood Sedimentation Rate in the Patient with Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis.

下であった。

関節リウマチ患者の関節液中の Try 含量と stage の関係は Table 5 に示すように stage I が最も高値を示し, 次いで stage II, stage III となつてゐるが有意差を認めなかった。また血液中の Try 値は stage II が最も高値を示し, ついで stage I, III となつてゐるが有意差を認めなかった。ただし stage IV の症例は集めることが出来なかった。

Table 2 Tryptophan Content in the Blood and Synovial Fluid in the Patient with Rheumatoid Arthritis

Patient	sex	age	blood sedim. rate		ASLO	RA	CRP	stage class J.H.			synovial fluid	blood
			1hr	2hr								
1	S. T.	♀	59	13, 33	12	+	+3	2	3	+	22.95 mM/ml	198.5 mM/ml
2	K. H.	♀	56	19, 43	12	+	-	1	1	+	14.80	-
3	H. T.	♀	57	33, 65	125	±	+3	1	1	+	23.21	271.9
4	S. T.	♀	60	52, 80	50	+	+2	2	2	+	22.94	-
5	N. H.	♀	55	47, 90	125	+	+2	1	1	+	20.72	-
6	R. O.	♂	32	25, 37	100	+	+2	1	1	+	20.72	300.0
7	K. K.	♂	73	95, 110	50	+	+2	3	3	+	15.67	-
8	K. O.	♀	4	37, 94	12	±	+4	1	1	+	24.56	-
9	U. H.	♀	67	90, 126	12	+	+6	3	2	+	21.41	237.4
10	S. K.	♀	54	17, 45	100	+	+2	2	3	+	11.14	-
11	M. S.	♀	20	34, 64	166	+	+3	2	3	+	23.52	302.1
12	H. H.	♀	76	90, 118	50	+	+2	3	2	+	21.82	-
13	S. T.	♂	55	110, 117	166	+	+6	2	2	+	17.78	323.7
14	R. K.	♀	58	23, 44	100	+	-	1	1	-	-	251.7
15	H. S.	♂	13	24, 45	50	+	-	3	2	-	-	284.9
16	M. Y.	♀	29	38, 98	125	±	±	2	2	-	-	224.4
17	Z. T.	♀	33	42, 76	125	±	±	2	2	-	-	289.2
18	M. T.	♀	37	25, 50	125	±	+2	2	2	-	-	278.4
19	S. M.	♀	18	27, 52	12	+	+5	3	4	-	-	269.7
20	Y. K.	♂	45	4, 21	125	+	+	1	1	-	-	285.3
21	G. K.	♂	70	95, 122	166	±	+	2	3	+	22.44	290.0
22	S. H.	♀	47	124, 130	50	+	+5	2	3	+	22.01	261.1
23	R. T.	♀	31	13, 39	100	+	±	2	3	-	-	265.4
24	I. S.	♀	54	14, 33	12	+	-	2	2	-	-	319.4
25	S. S.	♀	28	10, 23	625	-	-	1	1	-	-	250.3
Mean											20.38 ±3.69	272.4 ±30.7

J. H.= Joint Hydrops

Table 3 Tryptophan Content in the Blood and Synovial Fluid in the Patient with Osteoarthritis

patient	sex	age	blood sedim. rate		ASLO	RA	CRP	J.H.	synovial fluid	blood
			1hr	2hr						
1	S. O.	♂	53	1, 6	50	-	-	+	9.29 mM/ml	243.9 mM/ml
2	K. H.	♀	64	20, 45	50	-	±	+	11.00	-
3	M. N.	♂	73	5, 18	12	-	-	+	11.44	-
4	T. B.	♂	54	6, 13	50	-	-	+	13.51	287.3
5	H. S.	♂	75	6, 25	50	-	-	+	14.77	-
6	S. T.	♀	51	5, 20	12	-	-	+	15.76	-
7	N. K.	♀	60	11, 17	50	-	-	+	17.87	-
8	S. U.	♀	54	10, 16	50	-	-	+	8.33	-
9	H. H.	♀	36	12, 50	166	-	-	+	13.38	-
10	M. A.	♂	53	23, 48	50	-	±	+	9.28	-
11	S. I.	♀	79	20, 43	125	-	-	+	12.95	-

12	Y. O.	早	54	9, 21	125	—	—	+	15.54	310.8
13	K. T.	早	55	5, 17	12	—	—	+	12.08	—
14	Y. H.	合	57	7, 25	12	—	—	+	9.28	—
15	S. S.	合	52	4, 17	50	—	—	+	11.86	—
16	H. T.	早	44	18, 32	100	—	—	+	12.04	—
17	K. T.	合	32	2, 5	166	—	—	+	13.81	—
18	U. S.	早	74	10, 24	50	—	—	+	14.11	—
19	Y. M.	合	64	13, 35	100	—	—	+	9.28	—
20	T. Y.	早	53	6, 15	50	—	—	+	11.87	—
21	M. T.	早	68	7, 12	12	—	—	+	12.21	—
22	Y. S.	早	59	4, 11	100	—	—	+	17.69	—
23	S. K.	合	51	14, 34	12	—	—	+	13.81	—
24	S. S.	合	56	25, 45	12	—	+	+	16.19	224.4
25	K. I.	早	56	8, 21	100	—	—	+	7.81	—
26	H. H.	合	60	3, 8	50	—	—	+	10.79	—
27	S. T.	早	64	8, 15	12	—	—	+	10.19	—
28	T. K.	早	42	8, 22	50	—	—	+	13.90	—
29	Y. K.	早	25	2, 3	100	—	—	+	17.05	—
30	D. T.	早	57	7, 18	50	—	—	+	11.22	—
31	T. K.	早	60	5, 17	100	—	—	+	12.22	—
32	M. M.	早	53	4, 13	50	—	—	+	15.62	—
33	T. A.	早	75	24, 55	50	±	—	+	14.76	—
34	S. O.	早	63	23, 53	12	—	—	+	11.87	254.7
35	T. H.	早	78	13, 30	125	—	—	+	9.11	237.4
36	U. S.	早	36	13, 40	12	±	—	+	14.48	—
37	S. S.	早	62	13, 38	50	—	—	—	—	241.8
38	U. S.	早	45	32, 53	250	—	—	—	—	310.8
39	H. K.	早	56	5, 18	100	—	—	—	—	305.7
40	Y. I.	合	48	2, 5	100	—	—	—	—	185.6
41	Y. S.	早	73	25, 54	125	—	—	—	—	263.3
42	T. T.	早	40	25, 49	125	—	—	—	—	284.9
43	T. H.	早	73	7, 17	12	—	—	—	—	274.1
44	T. T.	早	54	5, 15	12	—	—	—	—	246.9
45	G. S.	合	48	9, 24	125	—	—	—	—	235.4
46	S. H.	早	36	9, 16	12	—	—	—	—	310.7
47	H. S.	早	56	14, 35	100	—	—	—	—	261.1
48	M. I.	早	59	3, 8	12	—	—	—	—	215.8
49	K. S.	合	48	6, 16	125	—	—	—	—	261.1
50	Y. S.	早	70	24, 55	100	—	±	—	—	280.6
Mean									12.67 ±2.63	261.8 ±33.2

J. H. = Joint Hydrops

Table 4 Relationship between Tryptophan Content in the Blood and Joint Hydrops in the Patient with Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis

	case	hydrops	tryptophan
Rheumatoid Arthritis	8	+	273.0mM/ml ±37.5
	10	-	271.8 ±24.6
	6	+	259.7 ±29.9
Osteoarthritis	14	-	259.8 ±35.5
	8	-	281.1 ±19.0

Table 5 Relationship between Tryptophan Content in the Synovial Fluid and Blood, and Stage in the Patient with Rheumatoid Arthritis

	synovial fluid	blood
stage I	14.80 mM/ml	271.9 mM/ml
	23.31	300.0
	20.72	251.7
	20.72	285.3
	24.56	250.3
Mean	20.82	271.8
stage II	22.95	198.5
	22.94	302.1
	17.78	323.7
	22.44	224.4
	22.01	289.2
	11.14	278.4
	23.52	290.0
		261.1
Mean	20.39	275.2
	15.67	237.4
Stage III	21.41	284.9
	21.82	269.7
Mean	19.63	261.0

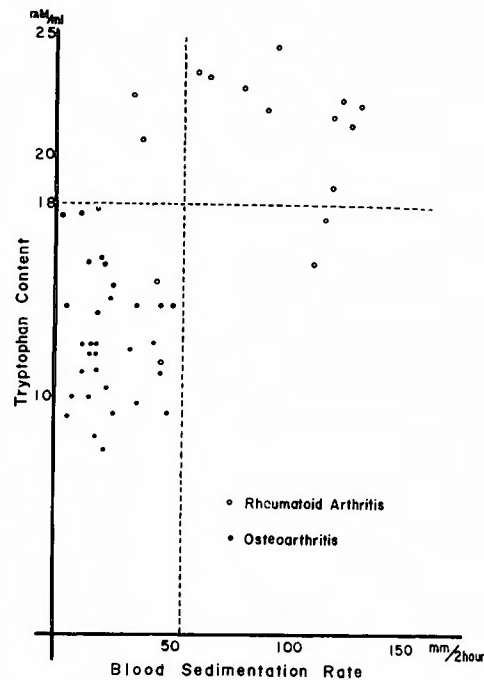


Fig. 3 Relationship between Tryptophan Content in the Synovial Fluid and Blood Sedimentation Rate in the Patient with Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis.

第3節 関節液中 Try 中間代謝産物について

関節リウマチ および 変形性 関節症患者の 関節液中 Kyn 含量は関節リウマチが平均 62.79±42.14 μg/ml, 変形性関節症では平均 8.74±6.44 μg/ml であり, 関節リウマチが変形性関節症の約 8 倍の 高値を示した (Table 6).

また関節液中の AA 含量は関節リウマチが平均1.44 ±0.41 μg/ml, 変形性関節症は0.33±0.27 μg/ml であり, 関節リウマチが変形性関節症に比較して約 4 倍の 高値を示した (Table 6).

一方関節液中の KA は関節リウマチが平均4.29± 1.61 μg/ml, 変形性関節症が平均9.54±2.99 μg/ml であり, 逆に変形性関節症が関節リウマチの約 2 倍の増量 を認めた (Table 7).

XA は関節リウマチが平均1.44±0.45 μg/ml, 変形性関節症が平均1.55±0.70μg/ml であり, 両疾患において有意差は認められなかつた (Table 7).

NA は関節リウマチが平均0.82±0.18 μg/ml, 変形性関節症は平均1.38±0.10μg/ml であり, 変形性関節症が関節リウマチより約 2 倍弱の高値を示した (Table 8).

Table 6 Kynurenine and Anthranilic Acid Content in the Synovial Fluid in the Patient with Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis

patient	sex	age	blood sedim. rate		ASLO	RA	CRP	Kynurenine	anth. acid
Rheumatoid Arthritis	Y. S.	♀	24	1hr 2hr 3, 20	50	+	±	27.72 µg/ml	1.73 µg/ml
	Y. H.	♀	47	124, 130	50	+	+3	30.16	0.86
	A. W.	♀	20	23, 55	125	+	+	112.00	2.01
	I. S.	♀	54	13, 39	100	+	+	118.08	1.48
	K. K.	♀	18	83, 122	12	+	+	26.00	1.12
	Mean							62.79 ±42.14	1.44 ±0.41
Osteoarthritis	K. H.	♀	66	6, 23	50	—	—	9.90	0.62
	S. O.	♀	63	10, 25	12	—	—	20.88	0.58
	K. T.	♀	36	9, 27	250	—	—	4.80	0.04
	S. S.	♀	72	61, 105	166	—	—	4.20	0.08
	T. K.	♀	51	5, 11	50	—	—	4.00	0.06
	Mean							8.74 ±6.44	0.33 ±0.27

Table 7 Kynurenic Acid and Xanthurenic Acid Content in the Synovial Fluid in the Patient with Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis

patient	sex	age	blood sedim. rate		ASLO	RA	CRP	kyn. acid	xan. acid
Rheumatoid Arthritis	N. W.	♀	20	1hr 2hr 23, 55	125	+	+	5.92 µg/ml	2.24 µg/ml
	Y. K.	♀	18	83, 122	12	+	+	3.20	1.44
	S. S.	♀	55	55, 100	166	+	+2	6.56	1.76
	H. T.	♀	58	37, 64	50	+	+	3.04	1.28
	G. K.	♂	70	95, 122	166	+	+	2.72	0.48
	Mean							4.29 ±1.61	1.44 ±0.45
Osteoarthritis	S. S.	♀	49	5, 18	12	—	—	13.44	1.02
	K. K.	♂	65	9, 21	100	—	—	6.88	1.76
	Y. O.	♀	53	1, 6	50	—	—	7.20	2.24
	Y. T.	♀	54	2, 5	125	—	—	7.20	2.24
	H. S.	♂	63	10, 16	50	—	—	12.96	0.48
	Mean							9.54 ±2.99	1.55 ±0.70

Table 8 Nicotinic Acid Content in the Synovial Fluid in the Patient with Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis

	Patient	sex	age	blood sedim. rate	ASLO	RA	CRP	Nic. acid
Rheumatoid Arthritis	G. Y.	♂	32	52, 80	100	+	+2	0.76 µg/ml
	H. T.	♀	58	37, 64	50	+	+	0.95
	T. S.	♀	66	33, 70	12	+	+3	0.55
	G. K.	♂	70	95, 122	166	+	+	0.76
	Y. K.	♀	20	38, 67	12	+	+4	1.08
	Mean							0.82±0.18
Osteoarthritis	M. T.	♀	62	3, 8	12	—	—	1.42
	Y. T.	♀	60	29, 55	50	—	—	1.34
	K. S.	♀	88	5, 17	12	—	—	1.21
	Y. O.	♀	54	1, 6	100	—	—	1.50
	K. H.	♀	66	6, 23	50	—	—	1.44
	Mean							1.38±0.10

第4章 考 按

関節リウマチの病態に関しては、細菌学、免疫学、病理学、生化学の各分野から追究されているにもかかわらず依然として未解決のまま現在に至っている。しかし本疾患は関節の特徴的な変化のほか、内分泌腺とくに副腎皮質系の機能失調と潜在的または顕性肝機能障害を伴う全身性疾患と考えられている。

したがって関節リウマチ患者において病変の最も顕著な関節、しかもその貯溜物である関節液における種々の成分の動態を知ること、関節リウマチの本態解明への一つの approach と考える。

最近関節リウマチ患者の尿中に複雑かつ特異的な pattern を示す Try 代謝産物の異常排泄に関する報告が数多くみられる。しかし関節液における Try 代謝産物に関する報告は全く見あたらない。したがって関節液中における Try 中間代謝産物の動態を知ことは関節リウマチの本態究明に重要な意義をもつものと考え

る。著者はPPCによつて、関節リウマチと変形性関節症患者の関節液中において Try 中間代謝産物に相違がみられることを認めたが (Table 1, Fig. 1), これは明らかに両疾患の血液および関節液中における Try 代謝系に相違が存在することを示唆するものである。

両疾患における血液および関節液中 Try 含量は Table 2, 3, Fig. 2が示すように、血液中 Try 含量は両疾患および対照例を含めて有意差を認めなかつ

た。しかし関節液中 Try 含量は関節リウマチが平均 $20.38 \pm 3.69 \text{ mM/ml}$ 、変形性関節症は平均 $12.67 \pm 2.63 \text{ mM/ml}$ と関節リウマチがかなりの高値を示した。

また両疾患の患者を関節水腫の有無により分類し、それぞれの血液中の Try 含量を比較してみると Table 4に示すように両疾患とも有意差を認めなかつた。したがって関節液中の Try 含量はかならずしも血液中の Try 含量を反映するものではなく、また血液中の Try 含量と関節水腫の有無とは無関係であることを認めた。こたは教室の山口³⁰⁾が関節液中の Na と K を測定し血液と違つた組成を認め関節液は単に血液中の透過成分が透過されて生成されるものではないと述べていることを裏づけるものとする。

両疾患の関節液中 Try 値と赤沈との関係は Fig. 3に示すように、変形性関節症では関節液中の Try 値は 18 mM/ml を越えたものではなく、また赤沈でも 55 mm/時間 を越えたものはなかつた。一方関節リウマチ患者の関節液中の Try 含量は25例中21例が 18 mM/ml 以上であり、合併症がない場合でも赤沈は25例が 55 mm/時間 以上を示しており、これらの所見は関節リウマチの診断にとつて重要な意義をもつものとする。

関節液中の Try を測定した Herrman (1958)¹³⁾¹⁴⁾も非炎症性疾患の関節液中の Try 値は $20 \sim 96 \text{ mg\%}$ と低値を示し、関節リウマチなどの炎症性疾患の関節液中 Try 値は $100 \sim 333 \text{ mg\%}$ と高値を示し、診断的価値を有すると報告しており、著者の成績と一致するところである。

血液中および関節液中 Try 値と stage の関係は Table 5 に示す通りであり, stage IV の患者は関節強直を来たし関節水腫を有する症例がほとんどなく実験に供することが出来なかつた。血液中および関節液中 Try 値はいずれも stage III がやや低値を示したが, 有意差は認められず, 関節リウマチの病勢の進行度との関連性はないものとする。

関節液の Try 中間代謝産物については, Table 6 ~ 8, Fig. 4 が示すように, Kyn 値は関節リウマチが平均 $62.79 \pm 42.14 \mu\text{g/ml}$, 変形性関節症は平均 $8.74 \pm 6.44 \mu\text{g/ml}$ であり, 関節リウマチが変形性関節症に比較して約 8 倍の高値を認めた。また AA 値は関節リウマチが平均 $1.44 \pm 0.41 \mu\text{g/ml}$, 変形性関節症は平均 $0.33 \pm 0.27 \mu\text{g/ml}$ であり, 関節リウマチが約 4 倍の高値を示した。

一方関節液中の KA 値は関節リウマチが平均 $4.29 \pm 1.61 \mu\text{g/ml}$, 変形性関節症は平均 $9.54 \pm 2.99 \mu\text{g/ml}$ であり, 逆に変形性関節症が関節リウマチに比較して約 2 倍の高値を示した。また NA 値は関節リウマチが平均 $0.82 \pm 0.18 \mu\text{g/ml}$, 変形性関節症は平均 $1.38 \pm 0.10 \mu\text{g/ml}$ であり, 同様に変形性関節症が約 2 倍の高値を認めた。しかし関節液の XA 値は両疾患とも有意差を認めなかつた。

Try 代謝経路図にしたがつてこれらの成績について検討してみると, Fig. 5 に示すように関節リウマチでは Kyn を経て AA へ集中的に代謝され, 変形性関節症においては KA および NA へと代謝されていくことから, 関節リウマチの Kyn が高値を示したのは代謝基

質としての Try が多いためではなく, 両疾患の患者の体内において Try 代謝に関する酵素系に異常があるのではないかと考えられる。

周知のように Try は Tryptophanpyrrolase の作用を受け Formyl kynurenine となり, これは Formylase の作用を受け Kyn となる。さらに Kyn からは三つの pathway に分れ, 一つは Pyridoxal-5-phosphate (PALP) を補酵素とする Kynureninase の作用を受け AA に至る pathway, PALP を補酵素とする Supernatant kynurenine aminotransferase の作用を受けて KA に至る pathway と Kynurenine 3-hydroxylase の作用を受けて 3-hydroxykynurenine に至る main pathway と三つの pathway がある。3-hydroxykynurenine は PALP を補酵素とする Kynureninase の作用によつて 3-HAA へ代謝され, さらに 3-hydroxyanthranilate oxyase の作用を受け NA へ移行するといわれている。

関節リウマチの関節液において Kyn 値と AA 値が高値を認めたことは 1) 代謝基質としての Try の増加, 2) Try から NA に至る pathway の代謝抑制, 3) Kyn から AA に至る pathway の代謝促進などが考えられる。

代謝基質としての Try の増加については, 関節リウマチと変形性関節症患者の食餌量に由来する相違は両疾患の血液中 Try 値に有意差がないことから考えられない。

関節液中における Try 値は関節リウマチがかなりの高値を示しており, これに関しては関節リウマチの滑膜の透過性の亢進を否定することは出来ないか, 教室

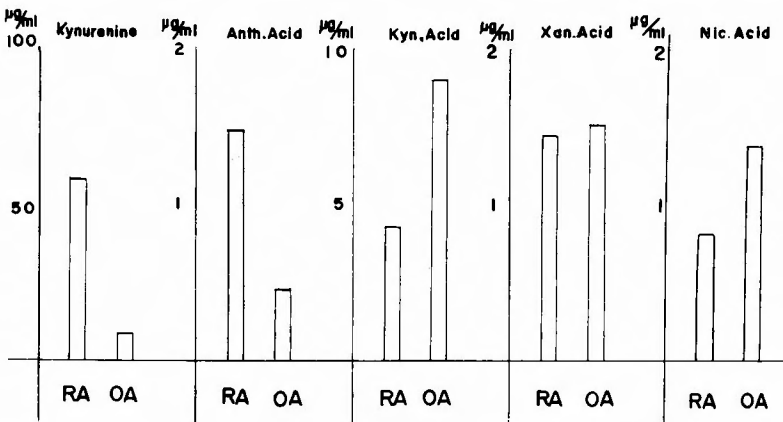


Fig. 4 Kynurenine, Anthranilic acid, Kynurenic acid, Xanthurenic acid and Nicotinic acid Content in the Synovial Fluid in the Patient with Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis.

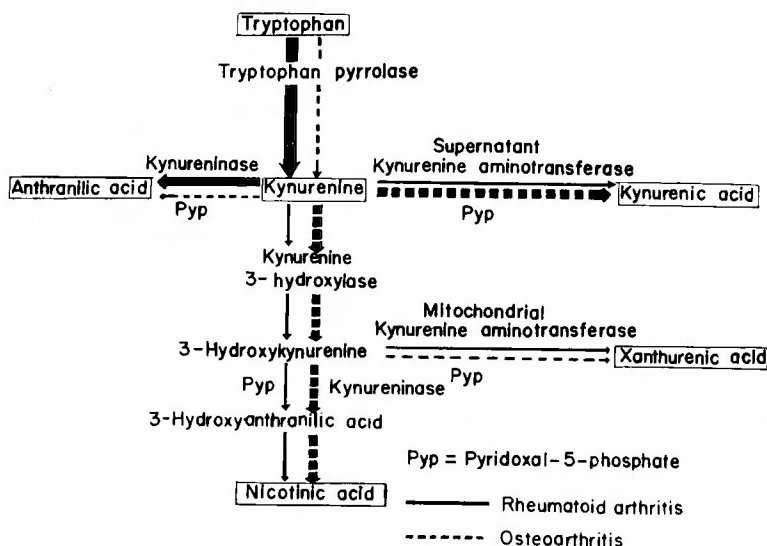


Fig. 5 Comparison of Metabolic Pathway of Tryptophan in the Synovial Fluid in the Patient with Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis.

の杉山¹²⁾は関節リウマチ、変形性関節症および対照例の関節腔内に Riboflavin を負荷することにより、一定時間後の残留度を調べた結果、正常関節で最も早く使用吸収され、次が変形性関節症であり、関節リウマチが残留度は最も大であつた。このことはもし滑膜の透過性の亢進があるならばB₂のごとき低分子化合物は急速に関節腔内より消失し、B₂残留度は小となるべきであり、関節リウマチ患者の関節中B₂総量の増加はB₂利用能の減退を来たしているためであつて、滑膜の炎症性変化による血液よりのB₂透過性の亢進の結果であるとする見解は否定的と考えたいと述べている。

Try から NA に至る pathway の代謝抑制については、肝臓で生成される Tryptophan pyrrolase 活性が問題となる。Tryptophan pyrrolase は副腎皮質ホルモンにより活性が高められることが知られており³¹⁾、関節リウマチ患者には副腎皮質機能不全³²⁾³³⁾³⁴⁾が存在することから、関節腔内における Tryptophan pyrrolase 活性の低下が当然考えられるところである。猪狩、小原³⁵⁾らは Try C¹⁴を使用して関節液に Dexamethazone を加え解置後、Try が減少し Kyn が増加することを認めている。したがって関節リウマチ患者の関節腔内において酵素活性の低下があるために Try の利用能が低下し、関節リウマチ患者の関節液中 Try が高値を示すものとする。さらに Fig. 5 に示すように関節リウマチでは Kyn および AA が高値を示し、変形性関節症では KA および NA が高値を示したことは、関節リウマ

チでは NA への代謝が抑制され、また細胞の表層に存在すると考えられている Supernatant kynurenine aminotransferase の活性が低下しているために、Kyn が蓄積されて高値を示し、その防禦体制として AA へと代謝されるのではないかと考えられる。変形性関節症では KA および NA への代謝活性が低下していないために、Try および Kyn が蓄積されず速に終末産物へと代謝されていくので Try および Kyn が低値を示すものとする。

関節液中の Try 中間代謝産物に関する報告は著者のをもつて初めとするが、関節リウマチ患者の尿中 Try 中間代謝産物に関する報告は数多くみられる。1960年 McMillan¹⁵⁾ が関節リウマチ、変形性関節症、その他の整形外科的疾患および健常者における尿中 3-HAA の排泄量を測定した結果、変形性関節症、その他の整形外科的疾患および健常者は 33 例中 32 例は 125~500 $\mu\text{g/day}$ であり 1 例は 750 $\mu\text{g/day}$ を示したが、関節リウマチでは 125~2250 $\mu\text{g/day}$ の間にあり、そのうち 500 $\mu\text{g/day}$ 以下を示したものは 7 例にすぎず、関節リウマチ患者の尿中に 3-HAA がかなり多量に排泄されたと報告した。それ以来多くの追試¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾²⁰⁾によりそれが確認されただけでなく、関節リウマチ患者に l-Try を負荷することにより、Kyn 排泄量は健常者の約 6 倍の増加¹⁶⁾¹⁹⁾²⁰⁾²¹⁾、3-hydroxykynurenine は健常者の約 10 倍の増加¹⁹⁾²⁰⁾²¹⁾をみたという報告がある。

これらの異常排泄の発生機序を追究するために種々

の実験が報告されている。Bett¹⁷⁾ は Salicyl 酸とは全く関係は認められないが、Pyridoxine を投与すると尿中の Kyn 排泄量が正常にもどると報告している。Jaffe³⁶⁾ および McKusick³⁷⁾ もそれを認め関節リウマチでは B₆ の代謝異常が存在するのではないかと述べている。また Spiera³⁸⁾ らは関節リウマチ患者の尿中 3-HAA 排泄量と飢餓、Salicyl 酸の投与、3-HAA の負荷、Try の負荷および Hydrocortisone の投与との関係を調べ、餓飢の状態 (72 時間の絶食) では尿中 3-HAA 値は正常排泄量 (150 μ g/day) の 1/2 に減少し、Salicyl 酸投与と 3-HAA を負荷した時は対照例とほとんど変わらず、Try を投与した時は約 2 倍の 3-HAA を排泄し、Hydrocortisone を投与すると約 3 倍の 3-HAA の増量をみたが、これは Hydrocortisone が、Tryptophan pyrrolase の活性を増加させるためであろうと述べている。しかしその機序は依然として不明である。

さらに Pasquariello³⁹⁾ は関節リウマチ患者において、NA の誘導体である N₁-methyl-nicotinamide および N₁-methyl-2-pyridone-5-carboxamide の尿中排量を測定し、対照例よりも約 2 倍の高値を認めたと報告しているが、Primary pyridoxal-phosphate deficiency にみられた Xanthurenia が認められなかったことから、B₆ の代謝異常のほかになんらかの因子が作用しているのではないかと述べている。このように関節リウマチ患者の尿中においては main pathway の中間代謝産物の増加がみられ、Spiera³⁸⁾ は関節リウマチ患者においては Try に関する代謝活性が高いと述べている。しかしながらもし関節リウマチ患者の体内において Tryptophan main pathway の代謝活性が高いとするならば体内において Try および Kyn は相対的に健常者や変形性関節症よりも低値を示すべきであり、Pyridoxine を投与すると尿中 Try 中間代謝産物が正常にもどることから、むしろ関節リウマチ患者の体内においては潜在性あるいは顕性の肝、副腎機能不全などの Tryptophan pathway の代謝活性を阻害する因子が存在するものと考ええる。

第 5 章 結 論

関節リウマチ患者および変形性関節症患者の関節液および血液中の Tryptophan 値の変動および関節液中の Tryptophan 中間代謝産物の変動を比較検討し次のとき結論を得た。

1. 関節リウマチおよび変形性関節症患者の関節液を paper chromatography によつて分離、同定した結

果、両疾患の関節液中において Tryptophan 中間代謝産物に相違がみられることを認めた。これは明らかに両疾患における Tryptophan 代謝系に相違があることを示唆するものである。

2. 両疾患における血液中 Tryptophan 値は両疾患および健常者とも有意差を認めなかつたが、関節液中の Tryptophan 値は変形性関節症に比較して関節リウマチがかなりの高値を示した。また両疾患の患者を関節水腫の有無により分類し、それぞれの血液中の Tryptophan 値を比較してみたが、両疾患における関節水腫のある群とない群の血液中 Tryptophan に有意差は認められなかつた。両疾患の関節液中 Tryptophan 値と赤沈との関係は、変形性関節症の関節液中 Tryptophan 値は 18 mM/ml を越えたものではなく、赤沈でも 55 mm/時間を越えたものはなかつた。一方関節リウマチでは 25 例中 21 例が 18 mM/ml 以上であり、ほかは合併症がない場合でも赤沈が 55 mm/時間以上を示したものは 25 例中 21 例であり、これらの所見は関節リウマチの診断にとつて重要な意義をもつものとする。

血液中および関節液中 Tryptophan 値と stage の関係は有意差が認められず、関節リウマチの病勢の進行度と Tryptophan 値の間には関連性は認められなかつた。

3. 関節液中の Tryptophan 中間代謝産物については、関節リウマチが変形性関節症に比較して、Kynurenine 値で 8 倍、Anthranilic acid 値で 4 倍の高値を認めた。一方 Kynurenic acid 値は逆に変形性関節症が 2 倍の高値を示し、Nicotinic acid 値も同様に変形性関節症が 2 倍の高値を認めた。しかし関節液中の Xanthurenic acid 値は両疾患とも有意差を認めなかつた。

このように関節液中の Tryptophan 中間代謝産物に関する成績はこれまでに報告された尿中の Tryptophan 中間代謝産物と違つた傾向を示した。これは Tryptophan pyrrolase 活性の低下があるために、関節リウマチ患者の関節液では Tryptophan の利能が低下し、Tryptophan main pathway の代謝が抑制されているものと考えられ、関節リウマチ患者の体内においては潜在性あるいは顕性の肝、副腎機能不全などの Tryptophan pathway の代謝活性を阻害する因子が存在するものと考ええる。

本論文の要旨は、11、12 回日本リウマチ学会において発表した。稿を終るにあたつてご指導とご校閲をいただいた恩師猪狩忠教授および小原喜重郎教授に心を感謝いたします。また本研究につき格別のご配慮

をいただいた小野繁助教授, 荒井三千雄助教授およびご援助をいただいた教室員諸氏に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 市原 硬, 坂本幸哉, 稻守寛治, 千畑一郎: トリプトファンの発見. トリプトファン (アミノ酸シリーズ (3)), 1-3, 1960.
- 2) Knox, W. E. : Relation of liver kynureninase to tryptophan metabolism in pyridoxine deficiency. *Biochem. J.*, **53** : 379-385, 1953.
- 3) Chiancone, F. M., Ginoulhiae, E., Mainardi, L. and Tenconi, L. T. : Experimental observation on relationships between tryptophan, vit. B₆ and the endocrine glands. *Acta Vitaminologia*, **1** : 12-20, 1953.
- 4) Rose, D. P. : Tryptophan metabolism in carcinoma of the breast. *Lancet*, **4** : 239-241, 1967.
- 5) Brown, R. R., Price, J. M., Satter, E. J. and Wear, J. B. : The metabolism of tryptophan in patients with bladder cancer. *Acta Unio Intern. Contra cacrum*, **16** : 299-303, 1960.
- 6) Piazza, M. and Tancredi, F. : Tryptophan-nicotinic acid metabolism in subjects recently or long since recovered from viral hepatitis. *Nature*, **197** : 903, 1963.
- 7) 橋谷田ヒデ: 肺結核患者の Tryptophan 代謝に関する研究. *結核*, **30** : 159, 1955.
- 8) Beetman, W., Fischer J. S. and Schroenloher, R. : Tryptophan metabolite excretion in connective diseases demonstrating a difference between rheumatoid spondylitis and rheumatoid arthritis. *P. S. E. B. M.*, **117** : 756-795, 1964.
- 9) Price, J. M., Brown, R. R., Rukavina, J. C., Mendelson, C. and Johnson, S. A. M. : Scleroderma (acrosclerosis). II. Tryptophan metabolism before and during treatment by chelation (ED TA). *J. Invest. Dermatol.*, **29** : 289-298, 1957.
- 10) Glazer, H. S., Mueller, J. F., Thompson, C., Hawkins, V. R. and Vilter, R. W. : A study of urinary excretion of xanthurenic acid and other tryptophan metabolites in human beings with pyridoxine deficiency induced by desoxyypyridoxine. *Arch. Biochem. Biophys.*, **33** : 243-251, 1951.
- 11) Greenberg, L. D., Bohr, D. F., McGrath, H. and Rinehart, J. F. : Xanthurenic acid excretion in the human subjects on a pyridoxine-deficient diet. *Arch. Biochem. Biophys.*, **21** : 237-239, 1949.
- 12) 杉山泰洋: 関節リウマチならびに変形性関節症におけるビタミンB₆代謝に関する研究. *岩手医学雑誌*, **4** : 286-297, 1966.
- 13) Herrman, H. : Über die Tryptophanbestimmung im Gelenkerguß, *Arch. Orthopäd. Unfall-Chirurgie*, **50** : 324-329, 1958.
- 14) Harrman, H. : Die Tryptophan-Bestimmung in Gelenkergüssen als Methode zu ihrer Unterscheidung. *Wien. Arch. Inn. Med.*, **34** : 41-52, 1940.
- 15) McMillan, M. : The identification of a fluorescent reducing substance in the urine of patients with rheumatoid arthritis. *J. Clin. Path.*, **13** : 140-148, 1960.
- 16) Bett, I. M. : Metabolism of tryptophan in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, **21** : 63-69, 1962.
- 17) Bett, I. M. : Effect of pyridoxine on tryptophan metabolism in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, **21** : 388-391, 1962.
- 18) Spiera, H. : Excretion of a tryptophan metabolite in rheumatoid arthritis. *Arth. & Rheumat.*, **6** : 364-371, 1963.
- 19) Pinals, R. S. : Tryptophan metabolism in rheumatic disease. *Arth. & Rheumat.*, **7** : 662-669, 1964.
- 20) Spiera, H. ; Excretion of tryptophan metabolites in rheumatoid arthritis. *Arth. & Rheumat.*, **9** : 318-324, 1966.
- 21) Flinn, J. H., Price, J. M., Yess, N. and Brown R. R. : Excretion of tryptophan metabolites by patients with rheumatoid arthritis. *Arch. & Rhemat.*, **7** : 201-210, 1964.
- 22) Crammer, J. L. : Paper chromatography of flavine nucleotides. *Nature*, **161** : 349-350, 1948.
- 23) 岡田吉美: トリプトファン (紫外部吸収測定法). *化学の領域*, 増刊, **33** : 79-81, 1958.
- 24) 小原喜重郎, 小野 繁: 黒血症の色素異常, *生体の化学*, **11** : 170-180, 1960.

- 25) Brown, R. R. and Price, J. M. : Quantitative studies on metabolites of tryptophan in the urine of the dog, cat, rat and man. *J. Biol. Chem.*, **219** : 985-997, 1956.
- 26) Walsh, M. P. : Separation and estimation of trptophan-nicotinic acid metabolites in urine-layer chromatography. *Clin. Chim. Acta*, **11** : 263-267, 1965.
- 27) Satoh, K. and Price J. M. : Fluorometric determination of kynurenic acid and xanthrenic acid in human urine. *J. Biol. Chem.*, **230** : 781-78, 1958.
- 28) 八木国夫 : ニコチン酸。最新ビタミンの定量法, 55-69, 1954.
- 29) 川崎近太郎 : ニコチン酸 及び ニコチン酸 アミド。ビタミン, 岩波全書, **9** : 177-188, 1967.
- 30) 山口光也 : 病的関節液の粘度と比重について。岩手医学雑誌, **17** : 313-321, 1965.
- 31) Feigelson, F. and Greengard, O. : Immunochemical evidence for increased titers of liver tryptophan pyrrolase during substrate and hormonal enzyme induction. *J. Biol. Chem.*, **237** : 3714-3717, 1962.
- 32) Elias, H., Krishna Murthy, A. S. and Elias, P. M. : Structure of the adrenal cortex in rheumatoid disease, including some observation on the adrenohypophysis. *Acta Endoor.* **51** : 99-113, 1966.
- 33) 松尾武澄 : リウマチ患者並びに泉浴家兎の副腎皮質機能に関する臨床的実験研究。温研紀要, **8** : 193-216. 1956.
- 34) 佐々木智也, 森永武志 : リウマチ様関節炎の副腎皮質機能。リウマチ, **1** : 51-54, 1958.
- 35) 猪狩 忠, 小原喜重郎, 小野 繁, 土沢正雄。未発表。
- 36) Jaffe, I. A. and Altman, K. : The effect of pyridoxine on the abnormal tryptophan metabolism in rheumatoid arthritis. *Arth. & Rheumat.*, **7** : 319, 1964.
- 37) McKusick, A. B. and Hsu, J. M. : Pyridoxine metabolism in rheumatoid arthritis. *Arth. & Rheumat.*, **5** : 308, 1962.
- 38) Spiera, H. and Christian, C. L. : Some factors influencing urinary excretion of 3-hydroxyanthranilic acid. *P. S. E. B. M.*, **116** : 944-947, 1964.
- 39) Paspuariello, G. and Tenconi, L. T. : Urinary excretion of nicotinic-acid derivatives in rheumatoid arthritis. *Lancet*, **21** : 675-676, 1964.

正 誤 表

第38巻 第2号 305頁 Fig. 2

308頁 Fig. 3 を次のように訂正します.

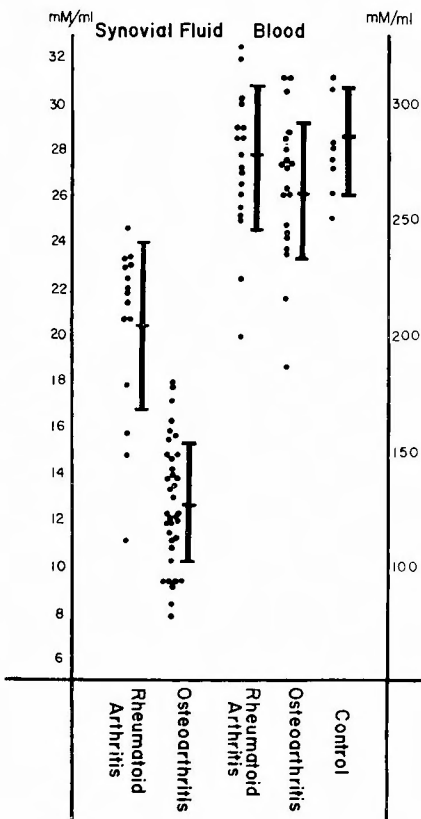


Fig. 2 Tryptophan Content in the Synovial Fluid and the Blood in the patient with Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis.

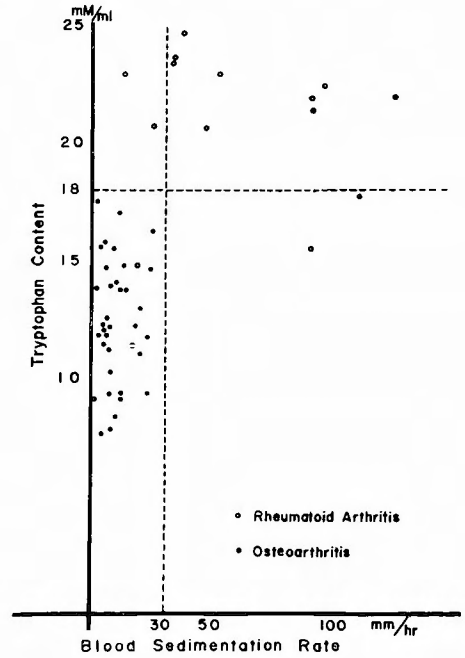


Fig. 3 Relationship Between Tryptophan Content in the Synovial Fluid and Blood Sedimentation Rate in the Patient with Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis.