

氏 名（本籍）	お せ ど 小 曾 戸	てつ 哲
学 位 の 種 類	医 学 博 士	
学 位 記 番 号	医 第 9 5 0 号	
学 位 授 与 年 月 日	昭 和 5 1 年 9 月 8 日	
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当	
最 終 学 歴	昭 和 4 3 年 3 月 岩 手 医 科 大 学 医 学 科 卒 業	
学 位 論 文 題 目	慢 性 関 節 リ ウ マ チ の 滑 膜 に お け る Lysosome 酵 素 の 組 織 化 学 的 研 究	

（ 主 査 ）

論 文 審 査 委 員 教 授 若 松 英 吉 教 授 杉 山 尚

教 授 森 富

論 文 内 容 要 旨

目 的

慢性関節リウマチ (RA) においては関節病変が滑膜の炎症に始まり、やがて軟骨破壊、骨破壊へと進展し関節の機能障害を呈してくる。この間の過程を生化学的、あるいは組織学的にとらえた観察は少なくない。すなわち関節液や滑膜の生化学的研究としてはライソゾーム酵素、キニン系物質、凝固線溶素、ムコ多糖、コラーゲンなどが対象となっている。これらの中でライソゾーム由来の蛋白分解酵素は関節病変成立に重要な役割をもっていると考えられている。一方関節の組織学的研究は枚挙にいとまがないが、その蛋白分解酵素の状態を観察出来ないのは当然であって、ここに組織化学的観察の必要性が生まれてくる。生化学的、組織化学的に種々ライソゾーム酵素活性が認められているが、これら酵素が炎症細胞に由来するものか、滑膜細胞に由来するものなのかなお論議が残されている。著者はこれらの点を明らかにしたいと考えて蛋白分解酵素の組織化学方法が確立されている、leucine amino peptidase(Lap.), acid phosphatase(Acp.), β -glucuronidase(β -glu.) の3者をRAの関節滑膜について観察した。

方 法

対象とした材料はすべてRAの滑膜切除、関節置換術などを行なった時に採取した。症例はアメリカ、リウマチ協会の診断基準でclassical RA, 20例, definite RA, 1例, 計21例である。関節部位別では膝関節15例, 股関節3例, 手関節2例, 肘関節1例である。対象群として受傷間もない関節外傷や切断肢より得られた滑膜を用いた。組織化学的標本作成と同時にすぐ隣接する部分より標本を採取し、10%フォルマリンで固定8 μ のパラフィン切片を作成した。(組織化学的方法) Lap. は、Burstone & Folk 法によった。採取した標本を4 $^{\circ}$ C, 4%ホルモール、カルシウム液に12時間固定後、ドライアイスで冷却したヘキサンで凍結させクリオスタットで12 μ の切片を作成した。この切片を直ちに浸漬液に入れ室温で反応させた。浸漬液はSubstrateにL-Leucyl- β -naphthylamide HClを、Coupling agentにFast garnet GBLSaltを使用し、0.2M Tris-HCl 緩衝液pH7.1で反応させた。Acp. はBurstone 法によった。4%ホルモール、カルシウム液に12時間固定後、12 μ で凍結切片を作成した。室温にて反応させ浸漬液はSubstrateにNaphthol, AS-BI phosphate, Coupling agentにFast Red Violet LB saltを使用し、0.2M 酢酸緩衝液pH5.2で行なった。 β -glu.は4%ホルモール、カルシウム液に24時間固定その後Holtのhypertonic Gumsacrose液に24時間固定し、12 μ の凍結切片を作成し37 $^{\circ}$ Cで反応させた。浸漬液はSubstrateにNaphthol

AS-BI β -D-Glucuronic Acid を, Coupling agent に para rosaniline HCl を使用し pH5.2 で行なった。(観察方法)組織学的所見, 臨床所見と組織化学的酵素活性を対比した。組織学的には滑膜の肥厚, 滑膜 lining cell の増殖, 炎症細胞の浸潤のあるものを活動性とし, 滑膜の細胞成分が少なくなり線維化したものを非活動性として比較した。臨床的にも関節の腫脹, 疼痛, 局所熱感のあるものを主体とし, Class, Stage, 血沈一時間値, 血清CRP, RA を参考にして活動性と非活動性に分けた。酵素活性は色素反応の程度により(-)から(4 +)までに分けた。

結 果

Lap. 活性: RA の滑膜組織では程度の差はあるが滑膜 lining cell に増殖がみられ, その酵素活性は著明であった。表層下に散在するマスト細胞に活性がみられたが, リンパ球, 好中球には活性はみられなかった。臨床, 組織学的所見と酵素活性の対比では, 臨床, 組織学上活動性のものはその酵素活性は非常に高く現われた。Acp. 活性: RA の滑膜では増殖した lining cell の胞体および周囲に顆粒状に染まるが特に増殖し染まるが特に増殖した滑膜の表層部に強く出現する傾向があった。滑膜内層の好中球, リンパ球, 組織球には活性はなかった。臨床, 組織学上活動性のものは酵素活性は高く, 組織学上非活動性のものは酵素活性は低かった。 β -glu. 活性: RA の滑膜ではいずれもが滑膜組織に広汎に活性が見られるが, lining cell に最も強く現われる。滑膜下層の線維芽細胞の胞体に活性を示す他, マスト細胞にも強く活性を示すが好中球, リンパ球には活性はなかった。臨床組織学上活動性のものは酵素活性は高い。臨床像とライソゾーム酵素との関連; 個々の関節について破壊の程度を Stage の分類に準じて評価し酵素活性との関係を見ると Stage II で最も活性が高かった。全身的活動度合を表わす血沈, 血清CRP, RA 値と局所の酵素活性の間には直接的関連はなかった。

総 括

1) 21例のRAの滑膜切除術時に採取した滑膜組織について酵素組織化学的にLap., Acp, β -glu. 活性の染色を行なった。2) 臨床, 組織学的に活動性のものはこれらのライソゾーム酵素活性は高い。3) Lap.は滑膜 lining cell に強い活性を示す。Acp.は滑膜 lining cell の表在の方にかたよって高い活性を示す。 β -glu. は lining cell の他滑膜内層にも活性を示す。4) 炎症性浸潤細胞である好中球, リンパ球には活性は見られなかった。5) ライソゾーム酵素活性の上昇が滑膜組織もしくは炎症細胞に由来するか論議されているが, 本研究からライソゾーム酵素の主な源は滑膜組織由来と考えられた。

審 査 結 果 の 要 旨

慢性関節リウマチにおける関節軟骨や骨の破壊の過程については、組織学的観察が数多くなされ、その形態学は確立されているものと見做してよい。しかし病変の主役をなすものが如何なるものであるかは未だ十分に解明されているとはいえない。このような物質の探究は関節液や滑膜の生化学的検索によってなされている。生化学的研究の対象となっているものはライゾゾーム酵素、ケミカルメディエータであるキニン系物質、フィブリノーゲン、プラスミンなどの凝固線溶素、ムコ多糖、コラーゲンなどであるが、これらのうちライゾゾーム由来の蛋白分解酵素がリウマチ病変に重要な役割をもっているといわれている。しかしこの蛋白分解酵素が関節滑膜に由来するのか、あるいは炎症細胞から産生されるのかなお議論のあるところである。著者はこの問題を追求すべく、ライゾゾーム由来の蛋白分解酵素を組織化学的検索を行なっている。またリウマチの滑膜における生化学と組織学の間隙を埋める蛋白分解酵素の組織化学的研究は意外にも少なく、本邦においては学会報告はいくつかあるとしても文献として参照するに足るものは見当らない。欧米でも Vainio が leucine aminopeptidase について、Waxman らと Muirden が acid phosphatase と β -N-acetylglucosaminase について報告しているにすぎない。そもそもライゾゾーム由来の蛋白分解酵素といってもそれぞれの特性を異にしており、また各々の特徴についてもわからないところを残しているので、著者はできるだけ多くの蛋白分解酵素を実験に利用すべく、組織化学的証明法の確立としている leucine aminopeptidase, acid phosphatase, β -glucuronidase の 3 つの酵素を取り上げ実験を行っている。手術時採取した 21 例のリウマチの滑膜について、組織化学的酵素活性について検索し、その活性を組織学的並びに臨床的な活動性と対比している。

観察の結果、臨床的にまた組織学的に活動性のものは 3 つのライゾゾーム酵素活性は高いことを認め、leucine aminopeptidase は lining cell や表層下に散在する mast cell に acid phosphatase は増殖した lining cell の胞体並びにその周囲に、 β -glucuronidase は lining cell, mast cell, fibroblast に活性を示すことをみたが、いずれも炎症性浸潤細胞である好中球やリンパ球に活性を認めなかった。以上のことからライゾゾーム酵素は滑膜組織由来であると結論している。

本論文は関節リウマチの生化学的研究と組織学的研究の gap を埋めるものとして価値があり、またそれぞれ特性の判っきりしていないライゾゾーム由来の蛋白分解酵素を従来の研究よりも多く集めて観察したことに意味がある。以上のことから学位に該当するものと認める。