

CASE REPORT

Isao Matsushita · Miwa Uzuki · Hiroaki Matsuno
Eiji Sugiyama · Tomoastu Kimura

Rheumatoid nodulosis during methotrexate therapy in a patient with rheumatoid arthritis

Received: May 23, 2006 / Accepted: August 7, 2006

Abstract We report a 62-year-old man with rheumatoid arthritis (RA) who developed nodulosis after methotrexate (MTX) treatment. The epithelioid cells of nodules were positive for matrix metalloproteinases (MMP)-2, MMP-3, MMP-9, and Ki67. The synovial tissues obtained from the same patient were negative for MMP-3, MMP-9, and Ki67. This study demonstrated that MTX-induced nodules are different from synovial tissues in terms of MMP expression, suggesting the presence of different pathologic mechanisms and differential MTX susceptibility.

Key words Immunohistochemical staining · Matrix metalloproteinase (MMP) · Methotrexate (MTX) · Rheumatoid arthritis (RA) · Rheumatoid nodulosis

Introduction

Rheumatoid nodules are characteristic extra-articular lesions often associated with severe or progressive rheumatoid arthritis (RA). We recently encountered a RA patient who developed multiple rheumatoid nodules despite improvement of joint symptoms by methotrexate (MTX) therapy. Occurrence of MTX-induced nodulosis has previously been reported,^{1–6} but the histopathological analyses of such nodules have been limited. We obtained rheumatoid

nodules and joint synovial tissues from a patient with MTX-induced accelerated nodulosis and compared their pathological features.

Case report

The patient was a 62-year-old man who presented with RA in 1986. Gold salt and D-penicillamine therapies were started in 1988, the former being discontinued because of onset of proteinuria. Since his arthritis was not controlled satisfactorily, MTX (5 mg/week) therapy was started in October 1990. He showed remarkable clinical improvement after one month and received 2.5 mg/week of MTX after May 1993. In 1995, at a total cumulative MTX dose of ~1000 mg, multiple subcutaneous nodular masses became apparent, mainly in his extremities, and increased in size and number thereafter. He was also suffered from severe deformities of right toes and forefoot pain during walking. In March 2002, the patient was admitted to our hospital for resection of the nodules and resection arthroplasty of his right toes.

A total of 22 subcutaneous nodules were located on the bilateral elbows, fingers, buttocks, right knee, bilateral ankles, right heel, and bilateral feet. All of these nodules were firm and indolent. The patient had no vascular lesions or peripheral neuropathy.

Laboratory tests showed an erythrocyte sedimentation rate of 22 mm/h, white blood cell count of 6170/μl, red blood cell count of 454 × 10⁴/μl, platelet count of 17.8 × 10⁴/μl, and C-reactive protein level of 0.8 mg/dl, suggesting that there was little inflammation. The levels of CH50 and MMP-3 were within the normal range, being 35 U/ml and 98.8 ng/ml, respectively. However, the rheumatoid factor level was high (883 IU/ml). Human leukocyte antigen (HLA) typing showed that he was HLA-DRB1 *1502 and *0803 positive.

On X-ray, there were no destructive changes to the shoulder, elbow, hip, knee, or ankle joints, but there was marked erosion and deformity of the fingers and toe joints. Chest X-ray showed no abnormalities.

I. Matsushita (✉) · T. Kimura
Department of Orthopaedic Surgery, Faculty of Medicine, University of Toyama, 2630 Sugitani, Toyama 930-0194, Japan
Tel. +81-76-434-7353; Fax +81-76-434-5035
e-mail: matusita@med.u-toyama.ac.jp

M. Uzuki
Department of Pathology I, School of Medicine, Iwate Medical University, Iwate, Japan

H. Matsuno
Matsuno Clinic for Rheumatic Diseases, Toyama, Japan

E. Sugiyama
Department of Internal Medicine I, Faculty of Medicine, University of Toyama, Toyama, Japan

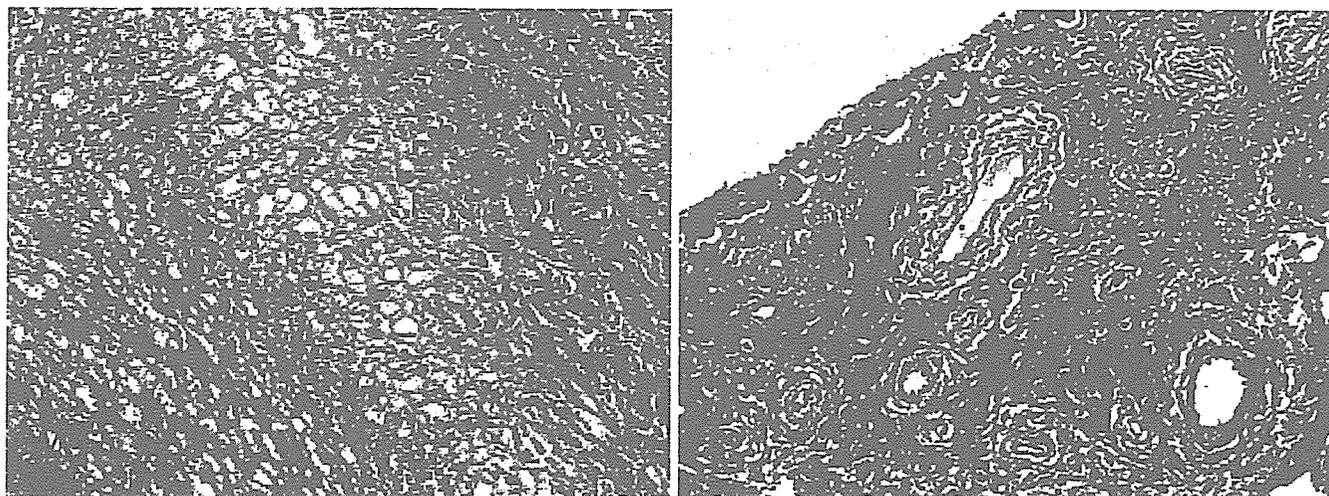


Fig. 1. **A** Photomicrograph of the resected subcutaneous nodules showed an amorphous necrotic substance containing neutrophils at the center of nodule, surrounded by epithelioid cells in a palisading pattern and lymphocytes. **B** Synovial tissue from the same patient showed multilayered synovial cells without pronounced villous proliferation. (**A,B** H&E stain, $\times 50$)

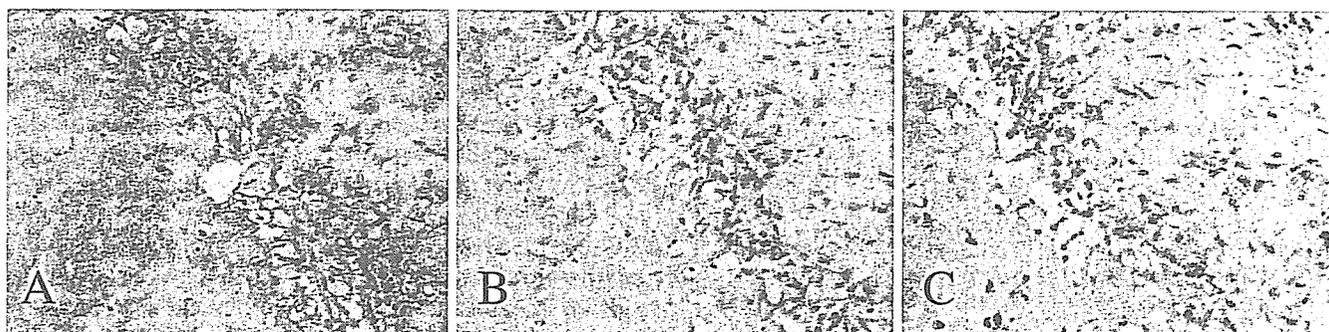


Fig. 2. **A** Immunohistochemical staining of the nodules showed that the epithelioid cells were positive for human leukocyte antigen-DR. Epithelioid cells in nodule were CD68-positive (**B**) and lysozyme-positive (**C**). (**A-C** $\times 50$)

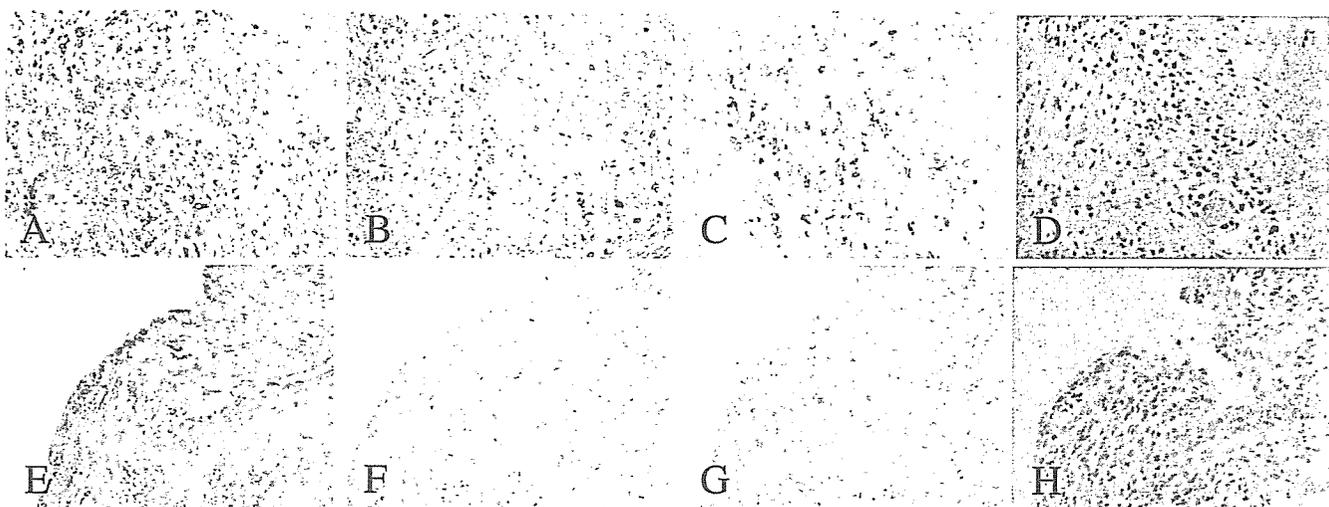


Fig. 3. **A** Epithelioid cells surrounding the necrotic center of the nodules expressed matrix metalloproteinase (MMP)-2 strongly. Some of the epithelioid cells were positive for MMP-3 (**B**), MMP-9 (**C**), and Ki67 (**D**). Immunohistochemical staining of synovial tissues showed MMP-2 expression (**E**), but MMP-3 (**F**), MMP-9 (**G**), and Ki67 (**H**) were not expressed. (**A-H** $\times 100$)

All subcutaneous nodules were surgically excised. On gross examination at surgery, the nodules were grayish-white, firm, and adherent to the subcutaneous tissue.

Histopathologic study of the resected nodules showed amorphous necrotic substance surrounded by epithelioid cells in a palisading pattern, which is a typical picture of rheumatoid nodules. Lymphocytic infiltration was noted in the surrounding tissues (Fig. 1A). Synovial specimen harvested from the metatarsophalangeal (MTP) joint of the right great toe showed multilayered synovial cells. However, villous proliferation and cell infiltration were unremarkable (Fig. 1B).

Immunohistochemical staining of the rheumatoid nodules showed that the epithelioid cells surrounding the necrotic center of each nodule were positive for HLA-DR (Fig. 2A). These cells consisted of numerous CD68-positive and lysozyme-positive macrophages (Fig. 2B,C). Analysis of matrix metalloproteinase (MMP) expression indicated that MMP-2 was strongly expressed by the epithelioid cells. MMP-3, MMP-9, and the cell-cycle related gene Ki67 were also detected in some of the epithelioid cells surrounding the necrotic center of the nodules (Fig. 3A–D), suggesting the presence of active inflammatory granulomatous process. Synovial tissues also showed MMP-2 expression; however, MMP-3, MMP-9, and Ki67 were not expressed by the synovial lining cells or interstitial cells (Fig. 3E–H).

Discussion

In 1986, Kremer and Lee¹ reported the occurrence of multiple subcutaneous nodules in 3 out of 29 patients on MTX therapy. Subsequently, MTX-induced multiple subcutaneous nodules were reported by various authors,^{2–5} including cases accompanied by other extra-articular lesions such as vasculitis and skin ulcers, and bronchiolitis obliterans with organizing pneumonia (BOOP). Interestingly, multiple rheumatoid nodules developed following improvement of arthritis by MTX therapy in all reported cases, including the present patient.

Spontaneous rheumatoid nodule is a typical manifestation of aggressive RA and is considered to be a consequence, at least in part, of common pathologic mechanisms of the disease. Analysis of cytokine profiles⁶ in such spontaneous rheumatoid nodule suggests that the nodule is a Th1 granuloma and that the damage to synovial joint tissues and subcutaneous tissue is caused by the same inflammatory mechanism. However, the MTX-induced rheumatoid nodules, as observed in the present patient, show marked contrast to spontaneous rheumatoid nodule, in that the MTX-induced nodules develop after effective suppression of synovial lesions.

In the present study, the MTX-induced nodules showed numerous activated epithelioid cells and expression of MMP-3 and MMP-9, suggesting the active nature of the granuloma in spite of regressed synovial lesion. The pathomechanism of such differential effects of MTX on the

synovium and rheumatoid nodule in certain susceptible individuals still remains to be clarified. As suggested by Merrill et al.,⁷ MTX increases adenosine concentration and shows adenosine A2 receptor-mediated anti-inflammatory effect within joint, whereas in extra-articular tissue, adenosine at relatively lower concentration may enhance nodule formation via ligation of A1 receptor on macrophages. It is thought that the inflammatory process mediated by adenosine A1 receptor induces inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β , and subsequently these cytokines enhance the expression of MMP-3 and MMP-9 in the epithelioid cells of nodules.

Segal et al.³ reported that all of their patients who developed multiple rheumatoid nodules during MTX therapy were positive for HLA-DR4, and this finding was supported by Jeurissen et al.⁴ Ahmed et al.⁸ reported that HLA-DRB1*0401 was detected in patients who developed MTX-induced nodulosis (at a frequency of 71.4%). However, HLA-DRB1*0401 was not found in the present patient. Since most of the reports of MTX-induced accelerated nodulosis have been in Caucasians, the immunogenetic background association in non-Caucasians remains to be determined.

In this study, the MTX-induced nodules were different from the synovial tissues in terms of MMP and Ki67 expression, which strongly suggests the presence of different pathologic mechanisms. Possible immunogenetic factors associated with the susceptibility to MTX are thought to be important for mechanisms of accelerated nodulosis, and should be clarified.

References

1. Kremer JM, Lee JK. The safety and efficacy of the use of methotrexate in long-term therapy for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1986;29:822–31.
2. Weinblatt ME, Trentham DE, Fraser PA, Holdsworth DE, Falchuk KR, Weissman BN, et al. Long-term prospective trial of low-dose methotrexate in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:167–75.
3. Segal R, Caspi D, Tishler M, Fishel B, Yaron M. Accelerated nodulosis and vasculitis during methotrexate therapy for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:1182–5.
4. Jeurissen MEC, Boerbooms AMT, Van de Putte LBA. Eruption of nodulosis and vasculitis during methotrexate therapy for rheumatoid arthritis. *Clin Rheum* 1989;8:417–9.
5. Kerstens PJSM, Boerbooms AMT, Jeurissen MEC, Fast JH, Assmann KJM, Van de Putte LBA. Accelerated nodulosis during low dose methotrexate therapy for rheumatoid arthritis. An analysis of ten cases. *J Rheumatol* 1992;19:867–71.
6. Hessian PA, Highton J, Kean A, Sun CK, Chin M. Cytokine profile of the rheumatoid nodule suggests that it is a Th1 granuloma. *Arthritis Rheum* 2003;48:334–8.
7. Merrill JT, Shen C, Schreiber D, Coffey D, Zakharenko O, Fisher R, et al. Adenosine A1 receptor promotion of multinucleated giant cell formation by human monocytes. *Arthritis Rheum* 1997;40:1308–15.
8. Ahmed SS, Arnett FC, Smith CA, Ahn C, Reveille JD. The HLA-DRB1*0401 allele and the development of methotrexate-induced accelerated rheumatoid nodulosis. *Medicine* 2001;80:271–8.

A case of vermiform appendix tumor

Miwa UZUKI¹⁾, Koki OTSUKA²⁾, Yuji AKIYAMA²⁾, Tomomi OHTSU³⁾,
Cynthia D. GUY⁴⁾ and Takashi SAWAI¹⁾

¹⁾ Department of Pathology, School of Medicine,
Iwate Medical University, Morioka, Japan

²⁾ Department of Surgery, School of Medicine,
Iwate Medical University, Morioka, Japan

³⁾ Division of Surgery, Iwate Prefectural Numakunai Hospital,
Iwate-gun, Japan

⁴⁾ Department of Surgical Pathology, Duke University,
Durham, North Carolina, USA

Diagnosis: inflammatory myofibroblastic tumor

Key words: vermiform appendix tumor, myofibroblast, inflammation

I. Objective of Consultation

We consulted about the histological diagnosis of a tumor and the relationship between 2 lesions (vermiform appendix and ileum) from a 48-year-old woman.

II. Clinical summary

A 48-year-old Japanese female had right lower abdominal pain in March 2005. In mid-April, she experienced abdominal pain and fever again. Her white blood cell count was high. Tumor markers (CA-125, CA19, CEA etc.) showed normal values. In late April, she was admitted to Iwate Prefectural Numakunai Hospital and an appendectomy was performed. The tumor was located in the end of the vermiform appendix and adhered strongly to the abdominal wall, small intestine and omentum. The tumor seems to be remaining at the wall of the small intestine and retroperitoneum by the examination of positron emission tomography (PET) imaging with the tracer ¹⁸F-fluorodeoxy glucose (FDG) at six weeks after the first operation. A second surgical operation was performed at Iwate Medical University to remove the residual tumor.

III. Pathological Findings

The vermiform appendix tumor was 6 cm × 2 cm in size. The cut surface of the tumor was yellowish-white and solid (Fig. 1). It caused occlusion inside the lumen of the appendix.



Fig. 1. The tumor of the vermiform appendix was 6 cm × 2 cm in size. The cut surface of the tumor was white-yellowish and solid. It caused occlusion inside the lumen of the appendix.

The border between the tumor and normal tissue was not clear. There were bizarre cells with inflammatory background (Fig. 2). Vacuoles were seen in giant atypical cells with lipid droplets. Beside the bizarre cells, there were spindle cells. Severe inflammation was seen around the tumor. Atypical cells were remaining at the surgical margin. At the time of the second operation, there was a 1-cm yellowish tumor without mucosal lesion at the wall of the small intestine 19 cm from the end of the ileum. The tumor adhered strongly to the

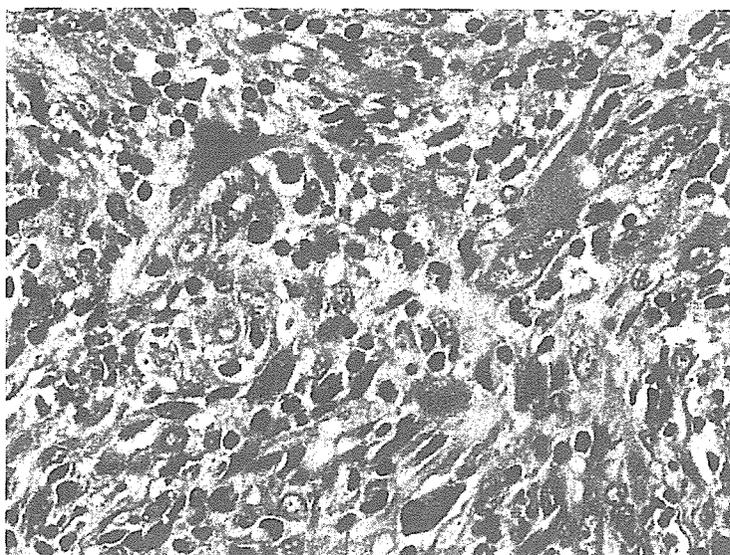


Fig. 2 . There were bizarre cells with inflammatory background. Beside the bizarre cells, there were spindle cells. Severe inflammation was seen around the tumor.

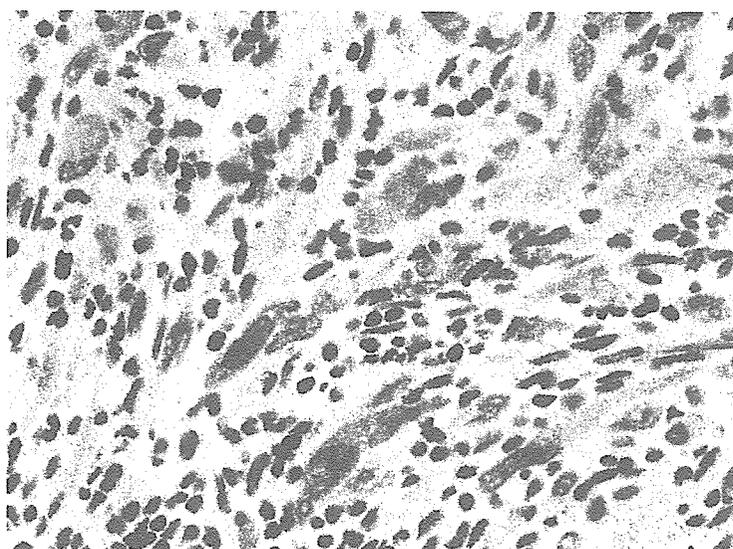


Fig. 3 . Immunohistochemically, atypical cells were positive for ALK (anaplastic lymphoma kinase).

retroperitoneum. There were atypical and bizarre cells as in the first operation.

Immunohistochemically, atypical cells were positive for vimentin, Ki67 (1%) and ALK (anaplastic lymphoma kinase) (Fig. 3), but negative for LCA (leucocyte common antigen), CD30, CD15, cytokeratin (AE 1, AE 3), EMA (epithelial membrane antigen), α -SMA (smooth muscle actin), desmin, myoglobin, S-100, chromogranin A, CD68, α 1-antitrypsin, lysozyme,

and HMB45.

IV. Reply from the Consultant (Guy, CD)

Diagnosis: appendix with findings compatible with inflammatory myofibroblastic tumor (vermiform appendix, ileum and retroperitoneal tissue).

The inflammatory process involving the appendix, small bowel, and retroperitoneum shows a mixture of lymphocytes, plasma cells,

eosinophils and few neutrophils. In addition, large atypical and spindled cells are admixed. This process appears to arise from the outer wall of the appendix and involves the retroperitoneum and small bowel. Per outside report, the process has been entirely surgically removed. Immunohistochemical stains show that the large atypical cells are positive for smooth muscle actin, desmin, AE1/AE3, and alkaline phosphatase. Questionable positive staining is seen with S100 and NSE. Immunohistochemical stains for CD30, CD15, CD68, EMA, and HMB-45 are negative.

Drs. Leslie Dodd and Tom Sporn have reviewed this case and concur that an inflammatory myofibroblastic tumor is likely. An inflammatory/repairative process, however, can not be excluded with certainty.

I certify that I personally conducted the diagnostic evaluation of the above specimen (s) and have rendered the above diagnosis (es).

V. Discussion

There were many differential diagnoses of this case from its histological findings, such as malignant fibrous histiocytoma, malignant leiomyosarcoma, pleomorphic liposarcoma, malignant melanoma, large cell lymphoma, retroperitoneal paraganglioma and inflammatory pseudotumor. We diagnosed this case as inflammatory myofibroblastic tumor (IMT) from the results of immunohistochemical staining. The atypical cells were positive for vimentin and ALK. Abnormalities of chromosome 2p23 with expression of ALK1 and p80 occur in both IMT and anaplastic large cell lymphoma. In IMT, immunohistochemistry for ALK1 and p80 is useful as an indicator of a 2p23 abnormality¹⁾.

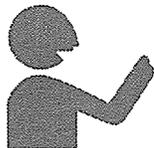
The myofibroblast was eventually recognized

as the principal cell type in the inflammatory pseudotumor, which provided the opportunity to redesignate this tumor as IMT. The concept of IMT has evolved from an already perplexing pathological process, the inflammatory pseudotumor, which was initially recognized in the lung and regarded as a pseudoneoplasm, although its histological features resembled a spindle cell sarcoma²⁾. Three basic histological patterns were reported: (a) myxoid, vascular, and inflammatory areas resembling nodular fasciitis; (b) compact spindle cells with intermingled inflammatory cells resembling fibrous histiocytoma; and (c) dense plate-like collagen resembling a desmoid or scar³⁾. Our case belonged to type (b). An aberrant or exaggerated response to tissue injury without an established cause has generally been favored as the pathogenesis of the inflammatory pseudotumor or IMT. Some of the clinical pathological aspects of the IMT began to suggest the possibility that these lesions are more similar to neoplasms than a postinflammatory process. The inflammatory pseudotumor and IMT occurred with the report of a mesenteric or retroperitoneal tumor with similar pathological features to the latter tumors but with more aggressive behavior to warrant an interpretation of malignancy as an inflammatory fibrosarcoma. The tumor in this case appeared to have malignant potentiality and should be followed up for a long period because of the histological findings and its growth. The IMT and inflammatory fibrosarcoma are histogenetically related, and the therapeutic approach to these tumors should rely primarily on surgical resection. Studies in the future may possibly resolve the question of whether the IMT and inflammatory fibrosarcoma are synonymous or closely related entities.

References

- 1) **Cessna MH, Zhou H, Sanger WG, et al.** : Expression of ALK1 and p80 in inflammatory myofibroblastic tumor and its mesenchymal mimics: a study of 135 cases. *Modern Pathology* **15**, 931-938, 2002.
- 2) **Coffin CM, Dehner LP and Meis-Kindblom JM** : Inflammatory myofibroblastic tumor, inflammatory fibrosarcoma, and related lesions: an historical review with differential diagnostic considerations. *Sem Diag Patho* **15**, 102-110, 1998.
- 3) **Coffin CM, Watterson J, Priest JR, et al.** : Extrapulmonary inflammatory myofibroblastic tumor (inflammatory pseudotumor). A clinicopathologic and immunohistochemical study of 84 cases. *Am J Surg Pathol* **19**, 859-872, 1995.

This consultation is in part of Iwate Medical Information System, supported by Iwate Prefecture



話 題

関節リウマチにおける 軟骨破壊とヒアルロン酸代謝*

宇月美和** 徳永勢二**,** 貝山 潤**,**
鎌滝章央** 澤井高志**

Key Words : hyaluronic acid, hyaluronic acid synthase (HAS), hyaluronidase, rheumatoid arthritis

はじめに

ヒアルロン酸(HA)はN-acetyl-D-glucosamineとD-glucuronic acidの二糖の繰り返しからなる多糖類で、分子量はオリゴ糖から数百万の高分子のものまで生体内には存在している。従来、HAの生体内での機能は細胞周囲の細胞外マトリックスとしての作用が主であるとみなされてきたが、最近では、細胞の分化、成長、移動や接着をはじめ、CD44のリガンドとしての細胞機能の活性化など多彩な機能が報告されている。さらに、HAの分子量によって細胞に及ぼす作用が異なっているという報告もあり、古くから知られた物質であるにもかかわらず、まだ明らかにされていないことが多い。

HAは全身に存在しているため、さまざまな病態で血中や尿中での濃度が変化する。よく知られているのはウェルナー症候群(早老症)で、尿中へのHAの排泄が亢進する。また、肝硬変などの肝機能障害の際には血中HA濃度が上昇する。組織に含まれるHAの量は動物種や臓器によって異なるが、鶏冠、ヒトの臍帯、関節液、軟骨、眼球の硝子体などに多く含まれており、とくに鶏冠から抽出されたHAはこれまでヒトの医薬品

や化粧品として広く利用されてきた。また、近年では関節炎の治療薬として利用されるようになったことから、HAの関節内での機能が注目されるようになってきている。軟骨組織内では、HAにアグリカンが結合して巨大分子のネットワークを形成する。HAは関節域では関節液をはじめとして軟骨、滑膜組織などに多く含まれており、粘弾性物質としての物理的な作用のほかに上述したような多彩な機能を有しているとされ、HAの減少は関節機能の障害と深く結びつくことが示唆される。

本稿では関節域でのHAの動態について述べる。

関節内でのHAの分布

はじめに滑膜組織におけるHAの分布について述べる¹⁾。滑膜組織でのHAは正常例や変形性関節症例(OA)ではびまん性に分布が認められるが、関節リウマチ(RA)では初期例から炎症が進行するにつれて分布が滑膜の表層に限局するようになり、やがてリンパ濾胞の形成を伴う炎症の最盛期や線維化期に至るとほとんど証明されなくなる(図1)。つまり、HAは炎症が高度になるとともに滑膜組織から消失していく。ここで問題になるのは、このHAの減少が滑膜からの産生そ

* The metabolism of hyaluronic acid and cartilage destruction in rheumatoid arthritis.

** Miwa UZUKI, M.D., Ph.D., Seiji TOKUNAGA, M.D., Akihisa KAMATAKI, Ph.D. & Takashi SAWAI, M.D., Ph.D.: 岩手医科大学医学部病理学第一講座[〒020-8505 盛岡市内丸19-1]; Department of Pathology, School of Medicine, Iwate Medical University, Morioka 020-8505, JAPAN

*** Jun KAIYAMA, M.D., Ph.D.: 岩手医科大学医学部整形外科学講座

**** 岩手県立胆沢病院整形外科

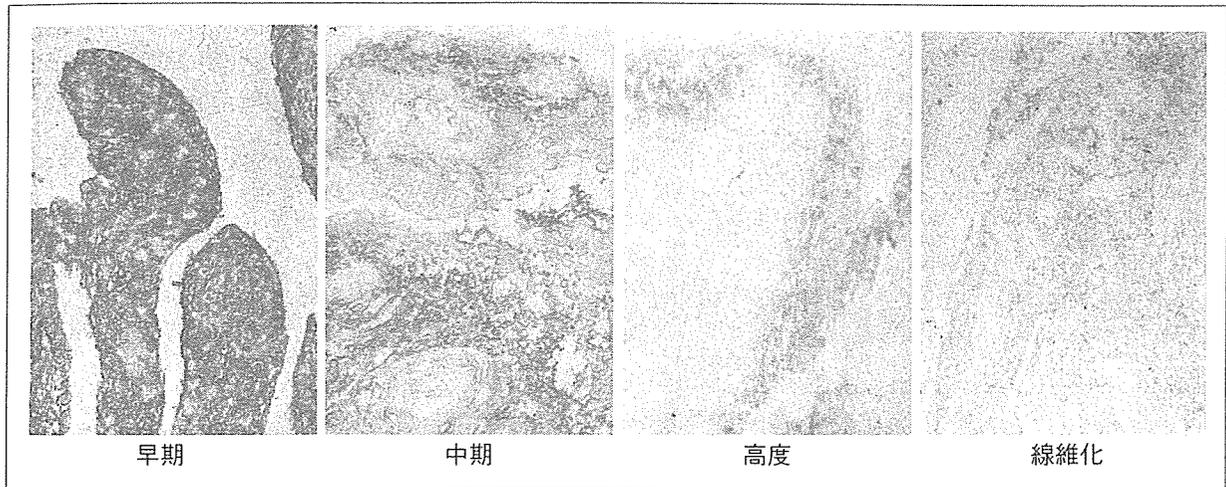


図1 ヒアルロン酸の分布(ヒアルロン酸binding protein : HABPによる)

RAの滑膜の炎症の程度を初期, 中期, 高度, 線維化と分類すると, HAの分布面積は初期>中期>高度>線維化と滑膜の炎症が高度になるにつれて減少していく。

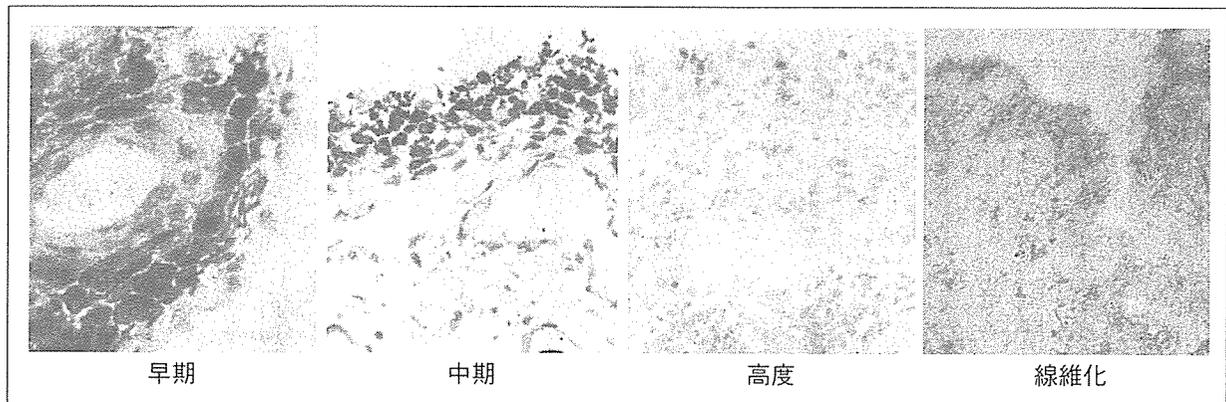


図2 UDPGD酵素活性

HAの合成過程で出現する酵素UDPGDの活性を証明することによって, 間接的にHAの合成活性を証明した. 滑膜の炎症が高度になるにつれてUDPGD酵素活性は初期>中期>高度>線維化と減少していく。

のものが減少することによるものなのか, 産生後に酵素などで分解されたために生じるものであるのかということである。

滑膜組織でのHAの合成^{2)~4)}

次に, HAの産生について合成酵素の酵素活性と, 合成酵素の蛋白やmRNAの発現の結果を述べる. HAが合成される際にはUDP-glucose dehydrogenase (UDPGD)が必要となるが, この酵素の活性を酵素組織化学的に証明することによりHAの合成能を間接的に証明すると, RAの初期, 中期, 炎症が高度な進行期, 線維化期と炎症が進むにつれてUDPGD酵素活性は減少し最後には証明されなくなる(図2)。

また, 最近では3種類のHA合成酵素hyaluronic

acid synthase (HAS)-1, HAS-2, HAS-3がクローニングされたが, それぞれのHASによって合成されるHAの分子量は異なっている. HAS-1, HAS-2は分子量200万程度の高分子, HAS-3は20万程度の低分子である. *In situ* hybridizationと免疫組織化学でそれぞれの陽性細胞の分布を検討した結果, HAS-1, HAS-2ともに滑膜表層細胞に認められるが, HAS-3は滑膜表層細胞のほかに炎症性細胞, 血管内皮細胞など多彩な細胞に認められた(図3). また, 症例間で比較すると, 高分子量のHAを合成するHAS-1は外傷やOAなどの非炎症性の滑膜組織に多く, RAでは早期から活動期と炎症が高度になるにつれて陽性細胞数は減少した. HAS-2もHAS-1と同様の傾向を示していた. 一方, 低分子量のHAを合成するHAS-3は滑膜表層細胞のほかに

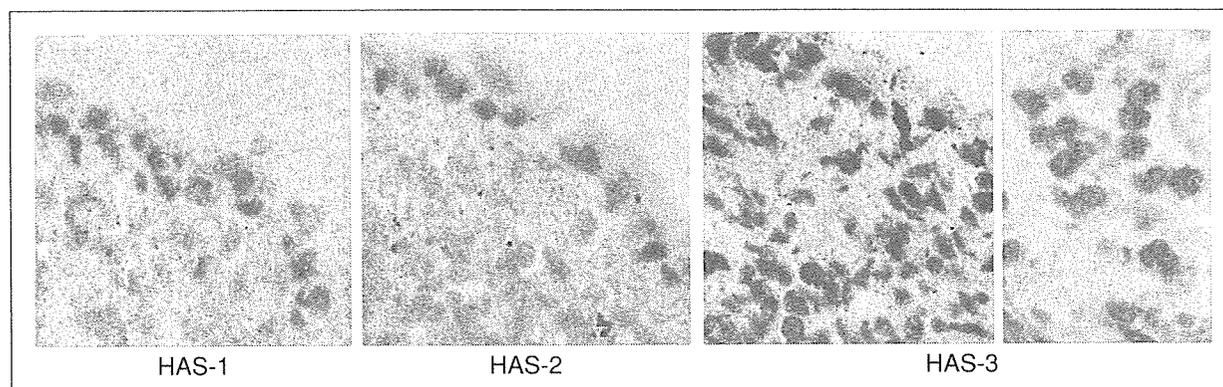


図3 ヒアルロン酸合成酵素(HAS-1, 2, 3)の*in situ* hybridization

高分子HA(分子量200万程度)を合成するHAS-1,2陽性細胞は滑膜表層に局限していたが, 低分子HA(分子量20万程度)を合成するHAS-3の陽性細胞は表層細胞のほかに炎症性細胞でも陽性であった。

血管内皮細胞, 炎症性細胞などで発現し, 炎症が高度になるにつれて陽性細胞が増加する傾向がみられた。そこで滑膜中のHAS-3陽性細胞数と滑膜組織の炎症スコアの関係について検討すると, 炎症が高度な滑膜組織ではHAS-3陽性細胞数も増加し, 正の相関を示していた(図4)。

これら一連の結果は, RAの滑膜の炎症の進行とともに①HAが分布, 産生ともに徐々に滑膜組織から減少していくことや, ②高分子量HAの産生減少や, ③低分子HAの産生増加の過程を示している。

HAの分解

HAの生体内での代謝は非常に速いが, その代謝のメカニズムの詳細は明らかではない。70kgのヒトの体内には15gのHAが含まれ, 毎日その1/3が代謝されるといわれている。生体内HAの50%を含む皮膚では, HAの半減期は約1日で, 軟骨のようにみかけ上不活性な組織でさえ半減期は1~3週間である。血流中では半減期は2~5分と非常に短い。このような異化作用の多くはヒアルロニダーゼによるものであると考えられている。

HA分解酵素としてはヒトではhyaluronidase(Hyal)-1, 2, 3のほかに数種類が報告され, それぞれの解析が進んでいる。Hyal-1とHyal-2が, 体細胞組織の主たるヒアルロニダーゼであるが, Hyal-1はヒト血清中から初めて単離された生体内のヒアルロニダーゼである。もう一つ広く発現し酸性条件下で活性をもつHyal-2はglycosylphosphatidylinositol-(GPI)結合で原形質膜

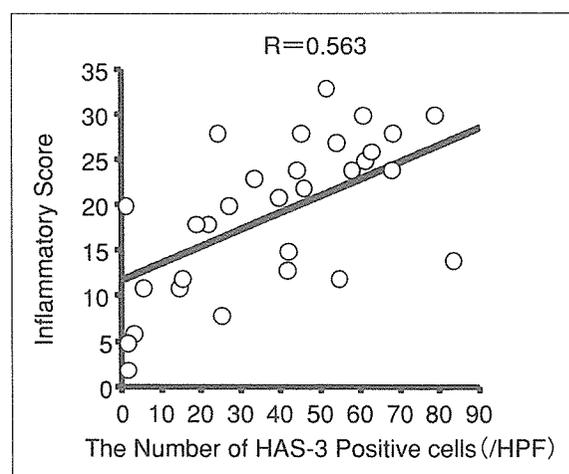


図4 RA滑膜組織におけるHAS-3陽性細胞数と滑膜組織の炎症の程度の相関

RA滑膜組織でのHAS-3 mRNA陽性細胞数は滑膜組織の炎症スコアとは正の相関($R=0.563$)を示し, 炎症が高度な滑膜ではHAS-3陽性細胞数も多くなっていた。

につながっていて, 高分子量のHAを約50個の二糖単位に相当する20kDaの限定サイズの断片に分解する基質特異性をもつ。HAはCD44とHyal-2のような受容体によって細胞表面に結合しHA-CD44-Hyal-2複合体を形成するが, Hyal-2による消化産物である20kDaのHA断片は細胞内に取り込まれたのちに, エンドソームに運ばれ, 最終的にリソゾームに運ばれる。リソゾーム中のHyal-1はHAを小さな二糖に分解し, さらにこの二糖は β -グルクロニダーゼおよび β -N-アセチルグルコサミニダーゼによって分解される。

関節域におけるヒアルロニダーゼについては, 関節液中にヒアルロニダーゼ活性が存在することが証明され⁵⁾, さらに滑膜組織や軟骨組織で

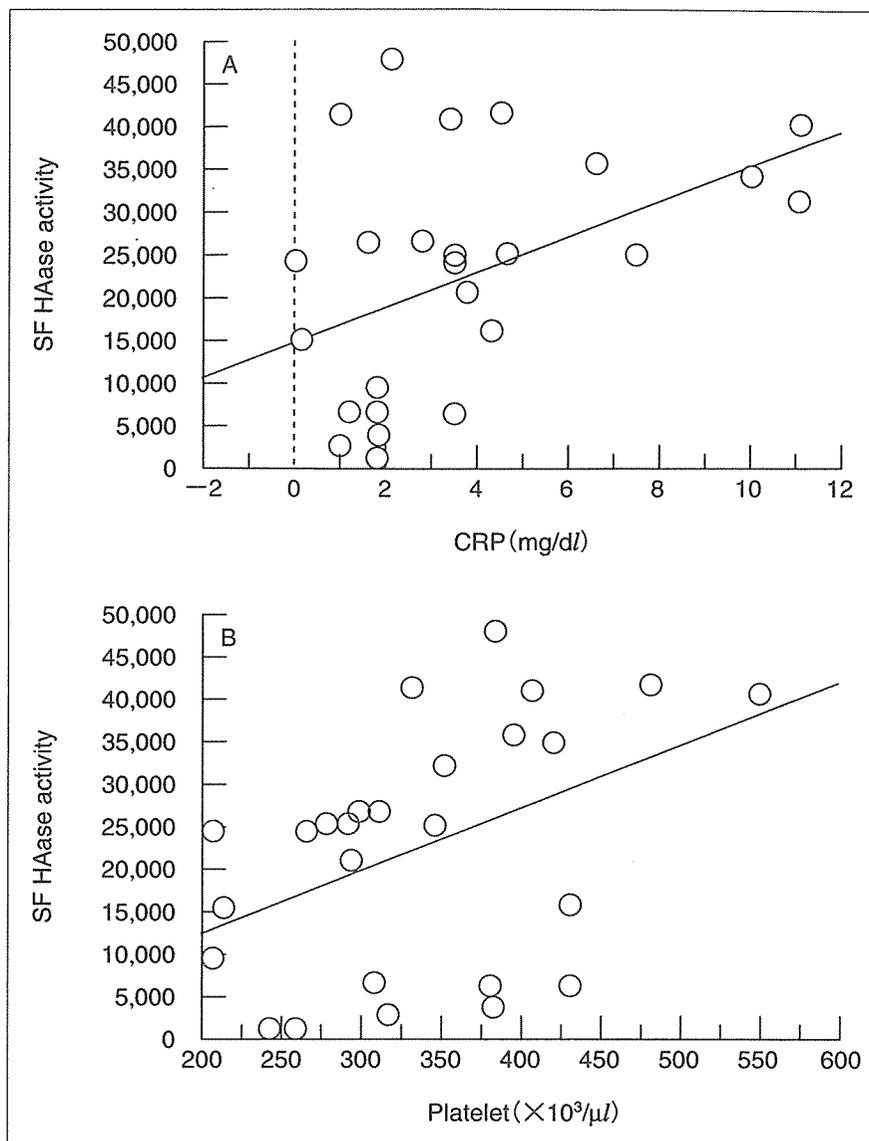


図5 RA患者の関節液中のヒアルロニダーゼ活性と各種マーカーとの相関
 A : RA患者の関節液中のヒアルロニダーゼ活性とCRPとは正の相関を示す ($r=0.458$),
 B : RA患者の関節液中のヒアルロニダーゼ活性と血小板数とは正の相関を示す ($r=0.45$).
 (文献⁵⁾より引用改変)

のmRNAの証明などいくつかの報告がある。Hyal-1, Hyal-2とHyal-3の発現は軟骨細胞で見出され⁶⁾, 線維芽細胞が軟骨細胞に分化する際に増加するとされ⁷⁾, 軟骨細胞の分化や代謝に重要な機能を示すことが示唆される。最近ではヒアルロニダーゼ活性と関節炎の炎症度との比較などが報告されており(図5)⁵⁾, RAの関節病変へのヒアルロニダーゼの関与を含め, 今後の詳細な検討が期待される。

関節液中のHAの動態⁸⁾

関節の運動の際に, 関節液の粘弾性は重要な保護因子であるが, HAは関節液に粘弾性を与える重要な成分のひとつである。とくに高分子, 高濃度のHAが高い粘弾性を示すが, 剖検例から得られた正常コントロールや外傷例などの対照群と比較してRA患者ではHAの濃度, 分子量ともに低下している。その結果, RA患者の関節液では粘弾性が低下し, 関節の潤滑液としての保護作用の低下に結びついている。

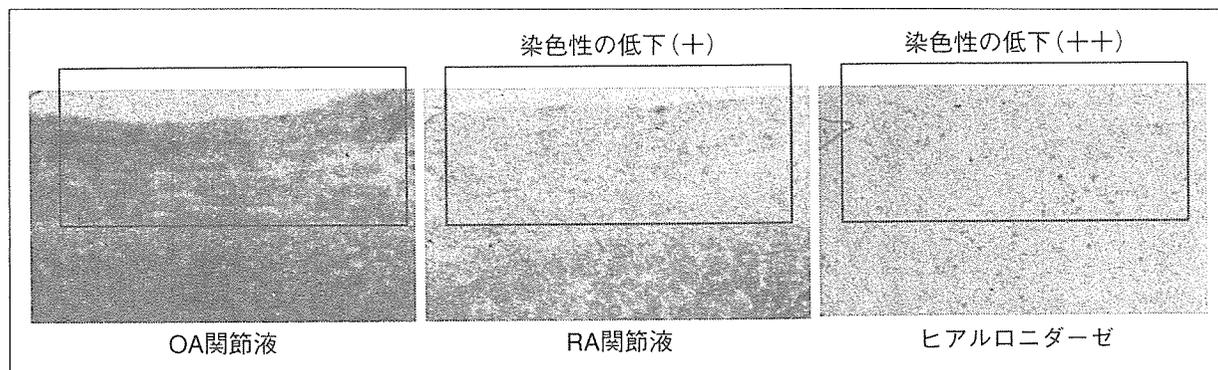


図6 RA患者の関節液中のヒアルロニダーゼ活性

ヒト軟骨組織にRA患者およびOA患者の関節液を反応させ、ヒアルロン酸の分布をHABPで比較した。ヒアルロニダーゼ精製品を対照とした。染色性が弱ければヒアルロニダーゼ活性が強いと判断される。その結果、RA患者の関節液を反応させた軟骨組織ではヒアルロン酸の染色性が低下しており、関節液中の成分によるヒアルロン酸の分解が示唆された。

また、同一関節から採取された滑膜組織と関節液を用いてHASの分布とHA分子量を検討した結果、滑膜でのHAS-3陽性細胞数の多い関節の関節液ではHA分子量が低下する傾向が認められ、HAS-3陽性細胞数と関節液中のHA分子量とは逆相関する傾向を示していた。この結果から、RA患者の関節液中でのHAの低分子化は低分子HAを合成するHAS-3の産生増加に伴う変化である可能性が示唆された。

最近では、関節液中のヒアルロニダーゼ活性をザイモグラフィで測定した結果がいくつか報告されているが(図5)⁵⁾、症例によって異なる活性値を示しており、関節液中のHAの代謝に影響を与えている可能性が示唆される。

HAの分子量と機能

高分子のHAはRAやOAなどの関節炎をはじめ、さまざまな疾患の治療に用いられている。一方、Hyal-2で分解された20kDaのHA断片は、強い血管新生作用や免疫刺激能をもち、炎症性サイトカインの刺激能もある⁹⁾。より小さい分子量のオリゴ糖では、抗原提示細胞である樹状細胞の活性化能をもち¹⁰⁾¹¹⁾、新生血管の内皮細胞の分化を促進する。このように、HA分解の過程で生じる低分子HAはその分子量に応じてそれぞれの機能を有することが示唆される。

また、低分子HAを合成するHAS-3のレベルは急性肺疾患のようなストレス状態をはじめ¹²⁾炎症の高度なRA滑膜でも増加するため、低分子HAは、

ヒアルロニダーゼによる分解産物として作られるだけでなく、HA合成酵素(HAS-3)の直接の生成物でもあり得る。また、活性酸素中間体からのフリーラジカルがあると、エンドグリコシド結合が切断されてHA断片が生じる¹³⁾¹⁴⁾。フリーラジカルとヒアルロニダーゼは炎症や創傷治癒の初期の段階の病変部に存在しうが、両者が協調してHA鎖を切断する可能性もある¹⁵⁾。

HA合成と分解のバランス

ヒアルロニダーゼ発現の調節に関しては、解明が進みつつある。培養細胞では、HA合成と分解は逆のパターンを示す。培養細胞の増殖期には、HAレベルは高く、ヒアルロニダーゼ活性はほとんど検出されない。細胞がconfluentになって増殖が停止すると、ヒアルロニダーゼ活性が急激に上昇し、HA産生能は低下する¹⁶⁾。未分化で増殖能の高い細胞では高いHAレベルを有し、逆にHA richな間質を失った細胞では増殖が遅くなり、分化のプログラムを開始するというものである。HAの合成と分解のバランスは細胞の分化や増殖にも影響を与える重要な因子であると思われる。

ヒアルロニダーゼは全身の広範囲に分布し、前述のように関節液内にも活性が認められる⁵⁾。それにもかかわらず、関節液や組織内のHAは分解され尽くされずにある一定の濃度や分子量を保っているが、ヒアルロニダーゼの活性化のためには至適pHのほかにもさまざまな条件が必要で

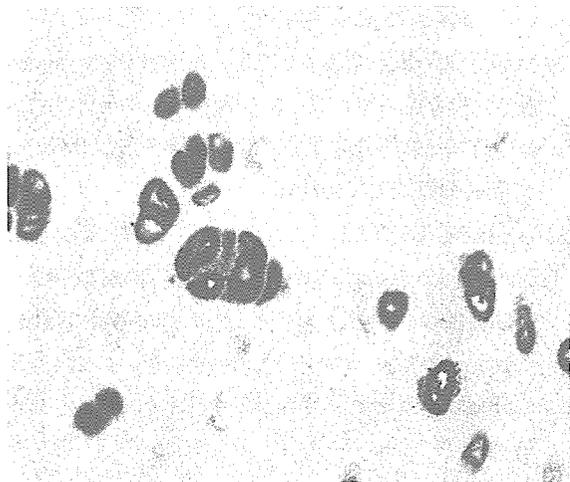


図7 軟骨組織でのヒアルロニダーゼmRNA
軟骨組織では一部の軟骨細胞がみずからヒアルロニダーゼを産生していた。

あることが示唆される。ヒアルロニダーゼは*in vivo*の細胞外マトリックス(ECM)中では不活性型やインヒビターと結合した形で存在するとされる。また、酸活性ヒアルロニダーゼは中性ではHA基質に結合しないため、中性での活性化のためには未知の分子や補因子の存在も示唆される。

血中のHAの動態^{17)~19)}

血中のHA濃度とRAの病態との関係については、RAの炎症や関節破壊の程度との相関など多くの報告があるが、血中HAの起源についてはいまだに明らかにはなっていない。これは前述のように、炎症性滑膜組織からの産生過剰である可能性や関節域で分解されて低分子化したものが血中に流入した可能性がある。著者らが検討した結果、RA患者ではコントロール群に比較して血中のHA濃度が有意に高値を示していた。ほかの種々の検査データと血中HA濃度との関係を検討すると、CRPとは若干相関する傾向がみられたものの、赤沈やほかの因子との相関はみられなかった。関節破壊については、Steinbrockerのstage分類で比較した際に、stageの高い症例で血中のHA濃度が高値を示す傾向(stage I < II < III < IV)が認められた。さらにLarsen分類による関節破壊の進行度と血中HA濃度との関係について検討したところ、過去1年間で関節破壊が進行した症例では、非進行群に比較して血中のHA値が高値を示す傾向が認められた。つまり、血中のHA濃

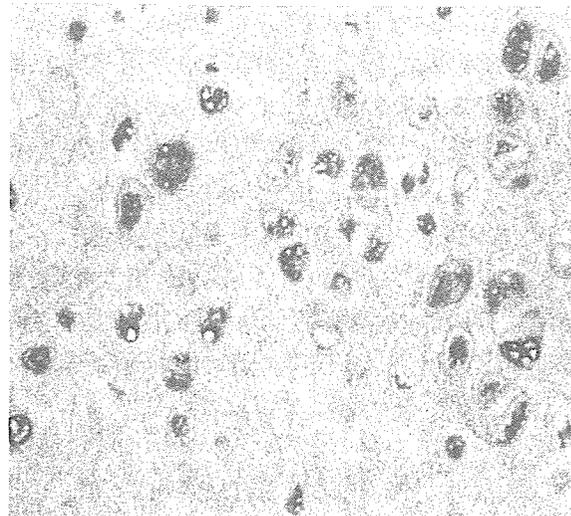


図8 軟骨組織でのNitric Oxide(NO)陽性細胞
軟骨組織では一部の軟骨細胞がNitric Oxide(NO)陽性であった。

度は測定時点での関節破壊の程度を表すのではなく、破壊が現在進行しつつあるかどうかという動的な「状態」を表す可能性が考えられる。血中HAの代謝速度は2~5分であるが、これが高値を示すということは、持続的なHA合成や分解の亢進を示すものと思われる。

軟骨におけるHAの動態

ヒトの軟骨組織にもHAが含まれているが、軟骨全体からすると乾燥重量ではごく微量である。軟骨組織内のHAは、その保水性や粘弾性のために軟骨にクッションのような物理的な機能を与えている。また、軟骨組織内ではアグリカンがHAに結合し、巨大分子を形成しているが、HAはそのための「芯」のような役割をもっている。そのため、軟骨でHAが失われるとこれらのプロテオグリカンの結合する「足場」がなくなり、軟骨内に安定した状態で留まることができなくなる。その結果として、HAの失われた軟骨組織では基質が不安定になっている可能性がある。実際にRAなどのような病的な関節ではHAをはじめとする軟骨の基質が変性し、減少や消失がみられるが、この現象の始まりの部分ではHAの分解が生じている可能性がある。前述のように、関節液中にはヒアルロニダーゼ活性が証明されているが、実際にヒトの軟骨組織にRA患者の関節液を反応させるとヒアルロン酸binding protein (HABP)

染色で陽性となるHAの減少が認められた(図6)。これは関節液の中にHAをはじめとする軟骨基質を分解する成分が含まれていることを示している。この現象はRA患者の関節液を反応させた場合に強く、OA患者の関節液の場合には弱かった。また、RA患者の軟骨周囲の肉芽組織あるいは軟骨細胞自身にもヒアルロニダーゼ(図7)や蛋白分解酵素、NOの発現(図8)が証明されており、HAのみならず多くの細胞外基質の分解が起きていることが証明されている²⁰⁾。

おわりに

以上、関節や血中におけるHAの動態について述べたが、RAではHAの代謝が活発に行われていることが示された。生体内のHAは分子量もさまざま、存在形態も①細胞外マトリックス内に存在、②体液中を循環、③細胞や組織に緩く会合、④プロテオグリカンが豊富なマトリックスに強固に結合、⑤CD44などの受容体によって細胞表面に結合、⑥細胞内に局在、など多くの状態をとりうる。このように物理的、化学的に多彩な状態のHAの代謝についてはそれぞれの状態や環境に応じて異なっている可能性があるが、詳細は明らかにはなっていない。滑膜から産生されるHAの分子量についてHAS-1, 2, 3のそれぞれの陽性細胞との関係に注目すると、RAの炎症性の滑膜組織においてはHAS-3による低分子HAの合成が亢進しているが、HAS-1, 2による高分子HAは関節内では消褪、低下が起きている。また、ヒアルロニダーゼについてもRA患者の関節では酵素活性が亢進していると思われる。これらのことより、RA患者の関節においては低分子HAが優位となることによって関節液の粘弾性が低下し、関節に物理的障害をもたらすことが示唆される。また、低分子HAは炎症性細胞の遊走や血管新生、サイトカインの活性化などの機能を有していることから、関節炎そのものの持続にも影響を与えるものと考えられる。

文 献

1) 宇月美和, 澤井高志. 各種臓器の生理的および病的状態におけるヒアルロン酸の分布—ヒアルロン酸binding proteinを用いた組織化学的検討—.

Connective Tissue 1994 ; 25 : 251.

- 2) 宇月美和, 澤井高志. ヒアルロン酸binding protein (HABP)を用いたヒアルロン酸の新しい検出方法. In : 日本組織細胞化学会・編. 組織細胞化学1998. 東京 : 学際企画 ; 1998. p. 177.
- 3) Uzuki M, Watanabe T, Katsura Y, et al. Quantitative histochemical study of hyaluronic acid binding protein and the activity of uridine diphosphoglucose dehydrogenase in the synovium of patients with rheumatoid arthritis. *Anal Quant Cytol Histol* 1999 ; 21 : 75.
- 4) Uzuki M, Itano N, Kimata K, et al. Expression patterns of hyaluronan synthases (HAS1, HAS2, HAS3) in the synovial tissue associated with change of molecular weight of hyaluronan in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003 ; 48 : S273.
- 5) Nagaya H, Ymagata T, Ymagata S, et al. Examination of synovial fluid and serum hyaluronidase activity as a joint marker in rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients (by zymography). *Annals of the Rheumatic Diseases* 1999 ; 58 : 186.
- 6) Flannery CR, Little CB, Hughes CE, et al. Expression and activity of articular cartilage hyaluronidases. *Biochem Biophys Res Commun* 1998 ; 251 : 824.
- 7) Nicoll SB, Barak O, Csoka AB, et al. Hyaluronidases and CD44 undergo differential modulation during chondrogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2002 ; 292 : 819.
- 8) 梅田俊彦, 三好照三, 澤井高志. 関節液ヒアルロン酸のゲルろ過クロマトグラフィーによる濃度及び分子量の測定. *Connective Tissue* 1997 ; 26 : 127.
- 9) Noble PW. Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair. *Matrix Biol* 2002 ; 21 : 25.
- 10) Termeer CC, Hennies J, Voith U, et al. Oligosaccharides of hyaluronan are potent activators of dendritic cells. *J Immunol* 2000 ; 165 : 1863.
- 11) Termeer C, Sleeman JP, Simon JC. Hyaluronan-magic glue for the Regulation of the immune response? *Trends Immunol* 2003 ; 24 : 112.
- 12) Mascarenhas MM, Day RM, Ochoa CD, et al. Low

- molecular weight hyaluronan from stretched lung enhances IL-8 expression. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003 ; 30 : 51.
- 13) McNeil JD, Webkin OW, Betts WH, et al. Depolymerisation products of hyaluronic acid after exposure to oxygen-derived free radicals. *Ann Rheum Dis* 1985 ; 44 : 780.
- 14) Hawkins CL, Davies M J. Direct detection and identification of radicals generated during the hydroxyl radical-induced degradation of hyaluronic acid and related materials. *Free Radic Biol Med* 1996 ; 21 : 275.
- 15) Moseley R, Waddington RJ, Embury G. Degradation of glycosaminoglycans by reactive oxygen species derived from stimulated polymorphonuclear leukocytes. *Biochim Biophys Acta* 1997 ; 1362 : 221.
- 16) Huey G, Moiin A, Stern R. Levels of [3H]glucosamine incorporation into hyaluronic acid by fibroblasts is modulated by culture conditions. *Matrix* 1990 ; 10 : 75.
- 17) Sawai T, Uzuki M. Dynamics of hyaluronate in patients with rheumatoid arthritis. *Connective Tissue* 2001 ; 33 : 253.
- 18) Sawai T, Uzuki M. Serum hyaluronic acid level is a good marker for evaluating the process of joint destruction in rheumatoid arthritis. *International Congress Series* 2001 ; 1223 : 273.
- 19) 山田 登, 宇月美和, 力丸 暘, ほか. 血中ヒアルロン酸濃度と慢性関節リウマチの病態. *リウマチ* 1994 ; 34 : 752.
- 20) 大内修二, 菅野祐幸, 宇月美和, ほか. 関節リウマチ関節液による関節軟骨細胞のアポトーシス誘導と高分子ヒアルロン酸投与による抑制効果. *臨床リウマチ* 2004 ; 16 : 280.

* * *

研 究

変形性膝関節症における
関節液のヒアルロン酸とその性状の変化

貝山 潤^{1,2)}, 宇月美和¹⁾

¹⁾ 岩手医科大学医学部, 病理学第 1 講座

²⁾ 岩手医科大学医学部, 整形外科科学講座

(Received on October 5, 2005 & Accepted on January 11, 2006)

要旨

関節液は関節軟骨に栄養を与える役割のほか、その物理的性状として関節の潤滑性を保ち、関節軟骨を保護する役割を有している。しかし病的関節ではそのような機能が損なわれていると考えられる。本研究では健常者および変形性膝関節症患者の関節液中のヒアルロン酸 (HA) 濃度、HA分子量と関節液の粘度、粘弾性について測定し、変形性関節症の原

因について関節液の物理的性状より検討した。その結果、変形性膝関節症では健常例に比べて関節液のHA濃度、HA分子量、粘度、粘弾性は低値を示した。また、粘度、粘弾性はHA濃度との間に強い相関を認めたことより、関節液の性状は主にHA濃度により左右されていることが明らかとなった。

Key words : osteoarthritis, synovial fluid, hyaluronic acid, viscosity, viscoelasticity

I. 緒 言

高齢社会の進行に伴い退行性疾患の患者数は増加の一途にあり、関節に起こる変形性関節症 (osteoarthritis : OA) もその一つである¹⁾。OAの主たる原因は関節軟骨の加齢変化に過度の力学的ストレスが加わるためと考えられているが^{2,3)}、その他にも様々な因子によって複雑な病態を形成していることが指摘されている。OAを誘発する因子としては、アポトーシス⁴⁾、サイトカイン⁵⁻⁷⁾ やスーパーオキシド⁸⁾、フリーラジカル⁹⁻¹¹⁾ などによる軟骨細胞の代謝の影響だけでなく、滑膜細胞や関節軟骨、関節液などによる関節の潤滑機構と荷重緩衝機構の破綻が挙げられている。とくに関節液の貯留はOAの代表的な所見であり、この貯留が原因であれ結果であれ、関節の機能だけでなく、症状の発現に大きな影響を与えている。正常の状態では関節液はプロテオグリカンを含む粘稠性の高い液体であり、その量は最大関節の膝関節で2～

3 mlで、関節の弾性と運動時における関節の潤滑性を維持する役割を担っている¹²⁾。関節液の性状あるいは量の変化は関節機能に異常な状態を引き起こす。関節液の主成分であるプロテオグリカンを構成する成分として、コンドロイチン硫酸、ケタラン硫酸、デルマトン硫酸などのグリコサミノグリカンやヒアルロン酸 (hyaluronic acid : HA) が大きな割合を占めており、なかでもHAは関節の機能を維持する重要な成分である¹³⁾。

今回、OAの病的状態を理解する目的で、関節内の潤滑機能、荷重緩衝機能に重要な役割を担っているHAを対象にして、HA濃度、HA分子量、関節液量、関節内総HA量、関節液の粘度、粘弾性について検討した。また、臨床的側面からはX線上の各病期でのHAの変化について検討した。

II. 研究材料および方法

2001年2月より2003年2月までの間に当科および関連施設の外来を受診した膝OA患者68例71膝(男性15例15膝, 女性53例56膝)より関節穿刺にて採取した関節液を対象とした。年齢は41~90歳, 平均68.8歳であった。X線病期およびOA経過分類は腰野分類¹⁴⁾を用いた。grade 1が17膝, grade 2が20膝, grade 3が16膝, grade 4が12膝, grade 5が6膝であった。関節液採取時に関節液量を測定した(採取量7~95ml, 平均21.4±12.7ml)。粘弾性測定は, このうち43例47膝(男性8例8膝, 女性35例39膝, 41~90歳, 平均69.9歳)を対象とした。X線病期はgrade 1が12膝, grade 2が11膝, grade 3が8膝, grade 4が11膝, grade 5が5膝であった。また, コントロールとして膝の愁訴および他覚的所見のない膝以外の下肢外傷の患者あるいは膝以外の下肢外傷後の内固定材抜去の患者(男性7例7膝, 14~44歳平均29.6歳)および保護者に術前に同意を得て, 手術時タニケット駆血下に膝関節より穿刺採取した(採取量0.5~2.5ml, 平均1.5±0.7ml)。粘弾性測定は5例5膝, 21~44歳, 平均35.8歳を対象とした。

1. HA濃度測定

HA濃度の測定は, 従来, カルバズール硫酸法¹⁵⁾, HA binding protein法^{16,17)}などによつての測定が行われてきたが, いずれの方法もタンパクなどの不純物質の影響があり測定精度に問題があると考えられたため, 酵素分解+Morgan-Elson法¹⁸⁾にて測定した。以下, 簡単にその概要を述べる。

1) 分析原理

ヒアルロン酸ナトリウムを単位二糖に分解する酵素であるヒアルロニダーゼSD(生化学工業)で処理し, 同じ処理をした濃度既知のヒアルロン酸ナトリウムを標準物質として, Morgan-Elson反応で比色定量した。

2) 検体の前処理

検体を1500 rpmで5分間遠心分離し, その上清に10 mMリン酸緩衝液(pH6.5)を加え, 10倍に正確に希釈した。次に, ヒアルロニダーゼSDを前記緩衝液で溶解し, 終濃度で0.5 U/mLとなるように等量加え, 37℃×3時間酵素処理した。酵素処理後, 分画分子量5000の限外ろ過器(再生セルロース膜/日本ミリポア社)でろ過し, 透過液を試料とした。

3) 検量線用標準液の作製

ヒアルロン酸ナトリウムを30~300 μg/Lの濃度になるように前記リン酸緩衝液で溶解した後, 検体の前処理と同様に処理し, 透過液を検量線用標準液とした。

4) HA濃度測定

試料および検量線用標準液50 μLにホウ酸試液(日本薬局方外医薬品規格1997)10 μLを加えて沸騰水浴中で3分間加熱した後, 流水で冷却した。次に, P-ジメチルアミノベンズアルデヒド試薬(日本薬局方外医薬品規格1997)300 μLを加え, 37℃で正確に20分間置いた後, 直ちに流水中で冷却した。585 nmの吸光度で測定し, 検量線用標準液の吸光度から検体中のHA濃度を算出した。

2. HA分子量測定

HA分子量は, 従来, 比粘度測定¹⁹⁾から算出されてきたが, 関節液中にはタンパク質や他のグリコサミノグリカンなどが共存し, それらによる影響を受けると考えられるため²⁰⁾, 検体を蛋白分解酵素で処理し, GPC-MALLS(Multi Angle Laser Light Scattering)法にて検体中のHA分子量を測定した。

1) 検体の前処理

検体を1500 rpmで5分間遠心分離し, その上清を生理食塩水で10倍に希釈した後, プロナーゼK(Boehringer Mannheim社)を終濃度で200 μg/mLとなるように加え(pH8), 40℃×24時間酵素処理した。処理後, HA濃度0.0025~0.0050%の範囲になるように0.2 M NaNO₃で希釈した後, 0.2 μmフィルターでろ過し, 試料とした。

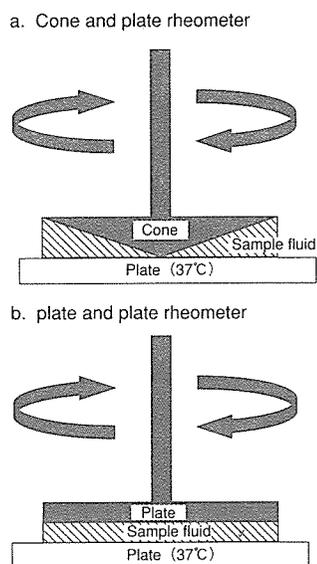


Fig. 1. Rheometer

It measured viscosity from the flow condition of the sample fluid in filling between cone and plate, or plate and plate.

2) 分析方法

カラムshodex SB-806HQ (300mm×8.0mm I.D), 移動相0.2M NaNO₃, 流量0.3ml/min, カラム温度40℃の条件で光散乱検出器(Wyatt Technology社), RI検出器(日本分光)を用い, GPC-MALLS法により試料中のHAの分子量を分析した²¹⁾.

3. 関節液の粘度測定

円錐平板型回転粘度計(Carri-Med社製レオメーター, CSL500)装置を用いた. 同一回転軸を持つ平円板と頂角の大きい直径4cmの円錐の間に試料を満たして平円板を37℃に保ち, 次に試料を層流状態で回転流動させて円錐の角速度を徐々に上げ, 円錐面に作用するトルクを経時的に測定した(Fig. 1 a). 測定結果より, 一定角速度 [rate = 100(1/sec.)] における粘度を算出した. また, 健常例では検体量が少ないためBohlin社製レオメーターCVO装置で直径2cmのプレートを使用した.

4. 関節液の粘弾性測定

装置はBohlin社製レオメーターCVO装置を用いた. 同一回転軸を持つ平円板と直径4cmあるいは2cmの亚克力製プレート間に試料を満たして平円板を37℃に保った. ギャップサイズの設定, プレートを回転と逆回転の操作の繰り返しに設定し, 回転速度を変化させて, プレート上における試料の流動状態を検出し, 粘弾性を測定した(Fig. 1 b). また, 今回の研究において, 粘弾性の測定は歩行時の周波数である0.5Hzでの値を指標とした. これは歩く時に1歩1秒と考えると1周期(左右1歩ずつ)は2秒となり1 cycle/2 sec = 0.5 cycle/1 sec と考えられるためである. そして, その時の貯蔵弾性率(elastic modulus: 以下G')と損失弾性率(viscous modulus: 以下G''), 位相差(phase angle)について測定した. また, 粘弾性の測定結果は高低差が著しく大きいため, 粘弾性の統計処理には対数を用いた.

5. 関節内総HA量

前記の分析方法にて求めたHA濃度と関節穿刺時に測定した関節液量を乗じて関節内総HA量を求めた.

統計学的検討はMann-Whitney U-test, Kruskal Wallis H-testおよびMann-Whitney U-test with Bonferroni Correctionにて行った. 有意水準は $p < 0.05$ とした.

III. 結 果

1. 健常例, OAにおける関節液量, HA濃度, HA分子量, 総HA量, 粘度

健常例での関節液量は 1.5 ± 0.7 ml (0.5~2.5ml), HA濃度は 3.31 ± 1.29 mg/ml (1.6~4.8mg/ml), HA分子量は 531 ± 65 万 (480万~660万), 総HA量は 5.1 ± 3.4 mg (1.3~11.8mg), 粘度は 130.7 ± 99.3 mPa·sec (50.2~238.6mPa·sec)であった. 一方, OAでは関節液量は 21.4 ± 12.7 ml (7~95 ml), HA濃度は 1.73 ± 0.56 mg/ml (0.5~2.8 mg/ml), HA

Table 1. Properties of synovial fluid and hyaluronic acid in control knee joints and the aging

Case	Age/Sex	Volume of Synovial fluid (ml)	HA conc. (mg/ml)	HA molecule weight ($\times 10^4$)	Total amount of HA (mg)	Viscosity (mPa·sec)	Elastic modulus (Pa)	Viscous modulus (Pa)	Phase angle (degrees)
1	14/M	2.5	4.7	520	11.8	N.D	N.D	N.D	N.D
2	14/M	0.5	4.8	490	2.4	N.D	N.D	N.D	N.D
3	21/M	1.5	4.2	500	6.3	238.6	11.72	6.28	28.4
4	28/M	1.5	3.3	550	5.0	191.0	16.67	7.42	23.2
5	43/M	2.0	2.2	480	4.4	56.0	0.96	0.96	45.9
6	43/M	2.0	2.4	520	4.8	50.2	2.91	1.29	25.4
7	44/M	0.8	1.6	660	1.3	37.3	3.30	0.98	15.9

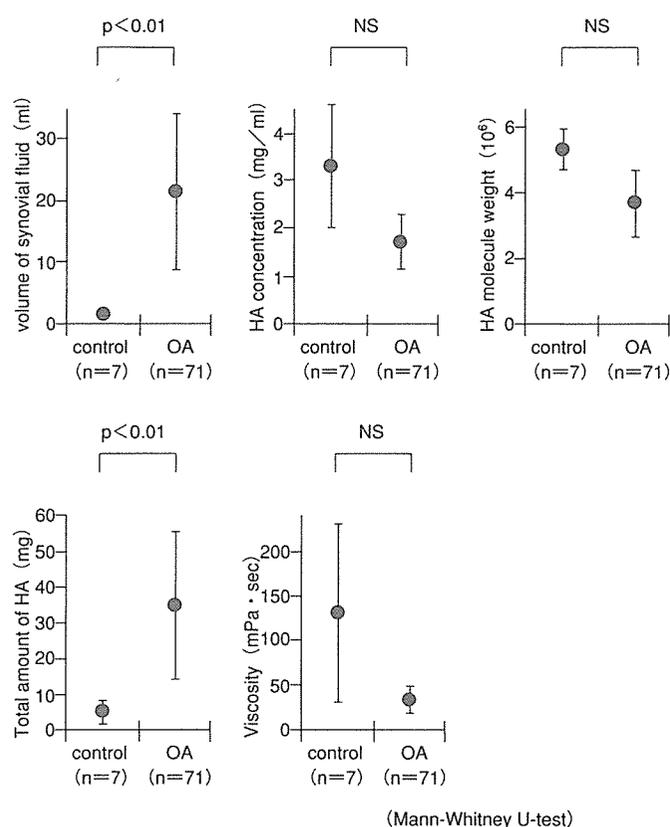


Fig. 2. Comparison of synovial fluid between normal and osteoarthritis
The synovial fluid of osteoarthritis was higher than normal synovial fluid in volume of synovial fluid ($p < 0.01$) and total amount of HA ($p < 0.01$).

分子量は 370 ± 103 万 (190万~630万), 総HA量は 35.1 ± 20.9 mg (7.0~95.0mg), 粘度は 33.1 ± 14.6 mPa·sec (14.3~73.0 mPa·sec)であった。HA濃度, 分子量, 粘度においては健常例に比べてOAでは低値を示したが有意差は認めなかった。健常例の検体数が少な

いため有意差は認めなかったが, 粘度において20歳代 (238.6~191.0mPa·sec, 平均214.8mPa·sec) は40歳代 (37.3~56.0, 平均47.8mPa·sec) よりも高値であった (Table 1)。関節液量 ($p < 0.01$), 総HA量 ($p < 0.01$) ではOAのほうが健常例より有意

Table 2 . Correlation coefficient of parameters of synovial fluid, hyaluronic acid and aging of the controls

	HA concentration	HA molecule weight	Viscosity	Total amount of HA	Age
Volume of synovial fluid	0.016	-0.353	-0.040	0.809**	0.057
HA concentration		-0.546	0.962*	0.533	-0.984 *
HA molecule weight			-0.328	-0.369	0.412
Viscosity				0.712	-0.998*
Total amount of HA					-0.505

* p<0.01
** p<0.05

- 1) Volume of synovial fluid showed positive correlation with total amount of HA.
- 2) HA concentration showed strong positive correlation with viscosity and strong negative correlation with age.
- 3) Viscosity showed strong negative correlation with age.

Table 3 . Correlation coefficient of parameters of synovial fluid, hyaluronic acid and aging of the patients with osteoarthritis

	HA concentration	HA molecule weight	Viscosity	Total amount of HA	Age
Volume of synovial fluid	-0.269 **	-0.089	-0.422*	0.805*	-0.244**
HA concentration		-0.204	0.795*	0.259 **	0.261**
HA molecule weight			0.179	-0.247**	0.048
Viscosity				-0.079	0.306**
Total amount of HA					-0.103

* p<0.01
** p<0.05

- 1) Volume of synovial fluid showed negative correlation with viscosity.
- 2) Volume of synovial fluid showed strong positive correlation with total amount of HA.
- 3) HA concentration showed strong positive correlation with viscosity .

に高値であった (Fig. 2).

2. 健常例における関節液の性状 (Table 2)

健常例において、それぞれの因子を相互に比較すると、関節液量と関節内総HA量に正の相関がみられ (r=0.809, p<0.05), 健常例では関節液が多くなるほど関節液中のHA量が多くなる傾向にあった。また、HA濃度と粘度に正の相関が得られ (r=0.962, p<0.01) (Fig 3 a), HA濃度が上昇すると粘度

が増すことが証明された。さらに、年齢とHA濃度 (r=-0.984, p<0.01) (Fig. 3 b) 年齢と粘度 (r=-0.998, p<0.01) (Fig. 3 c) との間に負の相関を認めた。つまり、健常例では加齢とともに関節液中のHA濃度と粘度が低下する傾向であった。

3. OAにおける関節液の性状 (Table 3)

一方、OAでは関節液量と粘度に負の相関 (r=-0.422, p<0.01) (Fig. 4 a) を、HA濃

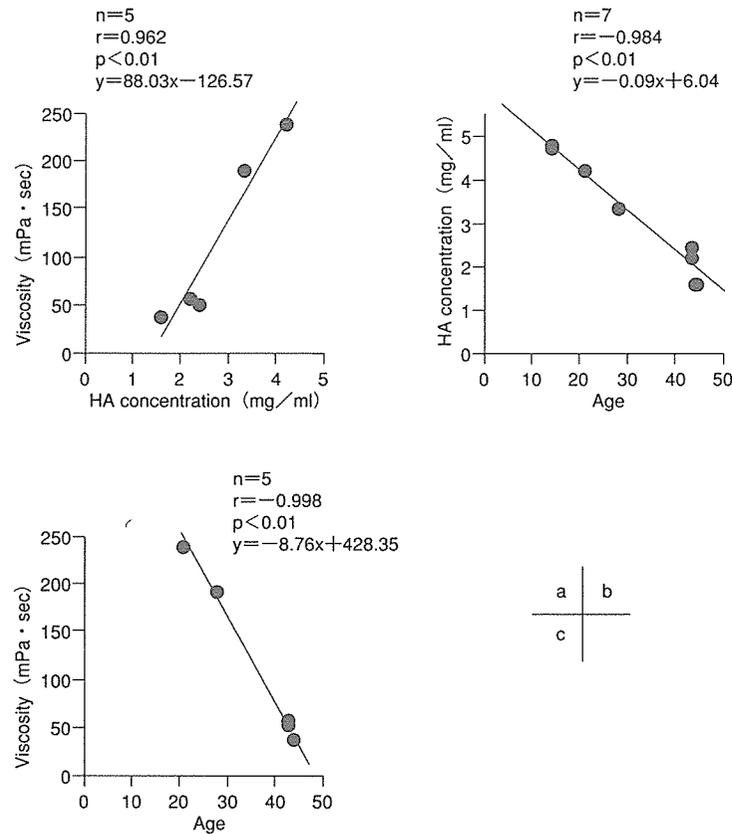


Fig. 3. Relation of HA concentration, viscosity and age of normal synovial fluid
 a: Correlation between HA concentration and viscosity HA concentration showed positive correlation with viscosity. ($r=0.962$, $p<0.01$)
 b: Correlation between age and HA concentration HA concentration showed negative correlation with age. ($r=-0.984$, $p<0.01$)
 c: Correlation between age and viscosity Viscosity showed negative correlation with age. ($r=-0.998$, $p<0.01$)

度と粘度に正の相関 ($r=0.795$, $p<0.01$) (Fig. 4 b) を認めた. さらに関節液量と関節内総HA量の間にも正の相関 ($r=0.806$, $p<0.01$) (Fig. 4 c) を認めた.

4. 病期および経過分類による相違

OAの関節液量, HA濃度, 分子量, 総HA量, 粘度をX線による病期, 経過分類別に比較すると関節液量では中期群grade 2, 3 (3.0~60.0ml, 平均 25.0 ± 13.4 ml), が初期群grade 1 (7.0~60.0ml, 平均 18.4 ± 12.2 ml) ($p<0.05$), 末期群grade 4, 5 (2.0~40.0ml, 平均 14.6 ± 10.2 ml) ($p<0.01$) に比較して有意に高値を示した (Fig. 5). 総HA量におい

てgrade 2 (11.0~79.5mg, 平均 42.8 ± 20.2 mg) はgrade 4 (4.2~62.5mg, 平均 21.3 ± 15.9 mg) に比較して有意に高値を示した ($p<0.01$). その他に有意な差は認めなかった.

5. 関節液の粘弾性と位相差

0.5Hzでの, 健常例の G' は 7.22 ± 6.83 Pa (0.96~16.48Pa), G'' は 3.40 ± 3.17 Pa (0.94~7.04Pa) であった. 一方, OAでは G' は 5.09 ± 8.47 Pa (0.002~30.2 Pa), G'' は 1.89 ± 2.70 Pa (0.007~10.4 Pa) であった. OAでは関節液量と対数 G' , 対数 G'' との間に負の相関を認めた (G' : $r=-0.458$, $p<0.01$, G'' : $r=-0.451$,