

原子吸光分光分析法による関節液中銅・亜鉛の 同時測定について

古 野 勝 志

岡山大学温泉研究所 温泉内科学部門

(主任 森永 寛 教授)

(1979年1月8日受付)

1. 緒言

近年、原子吸光分光分析法の臨床化学領域への導入により、生体内微量元素の測定が容易となり、諸種疾患時の病態解明の一端としての、生体内微量元素の動態に関する研究が注目されるようになってきた。

銅 (Cu)、亜鉛 (Zn) について、血清 (漿) を試料とした場合の本法による分析法、および、その臨床的意義に関する報告は多く見られる (玉利 1971, 土田 1971, NIEDERMEIER 1971, PRASAD 1976, 古野 1977)。一方、関節疾患の関節腔内に滲出貯留した粘稠度の高い関節液試料についての報告は、血清試料の場合に比べて少ない。今回、著者は、原子吸光分光分析法による関節液中 Cu・Zn 同時測定法の基礎的検討を行ない、更に、慢性関節リウマチおよび変形性関節症患者より得た関節液について、Cu・Zn の同時測定を行ったので、その結果について報告する。

2. 試薬、装置および測定試料

2-1. 試薬

ヒアルロニダーゼ：スプレーゼ (1管中 500 units を含む凍結乾燥品——持田製薬) を使用直前に蒸留水で希釈し 50 (u/ml) とし、Cu, Zn の測定値に影響がないことを確認し用いた。

グリセリン：和光純薬製特級。

銅、亜鉛標準液：原子吸光分析用標準液 (和光純薬製、銅、亜鉛それぞれ1000 ppm 含有)。

2-2. 装置

日立 207 型原子吸光分光光度計を使用し、前報 (古野 1977) で検討した最適条件下で測定した (Table 1)。なお吸光度は、記録計 (日立 QPD-54型) によりスケールの読み (mm) として読み取った。

2-3. 測定試料

岡山大学医学部附属病院三朝分院で、アメリカ・リウマチ協会の診断基準に基づき、慢性関節リウマチと診断さ

Table 1. Conditions of copper and zinc determination in synovial fluid using an atomic absorption spectrophotometer. (HITACHI MODEL207)

	Cu	Zn
Wavelength (Å)	3247	2139
Lamp current (mA)	10	9
Slit	1	1
Burner (type)	Premix	Premix
Acetylene pressure (kg/cm ²)	0.5	0.5
flow rate (l/min)	3.0	3.0
Air pressure (kg/cm ²)	1.8	1.8
flow rate (l/min)	13.0	13.0

れた男性12例、女性40例、計52例および、変形性関節症と診断された男性14例、女性39例、計53例の膝、肘、肩の関節腔より採取した関節液を、浮遊物がある時は遠沈 (3000 rpm, 20分間) し、その上清を使用した。又、ゲル状の関節液は試料約 2 ml 当り、ヒアルロニダーゼ (500 u/ml) を1滴 (約 0.05 ml) 加えて混和し、30分間室温放置後、遠沈し用いた。なお、試料中に赤血球が混入し溶血したものは除外した。

3. 関節液中銅・亜鉛同時測定法の検討。

3-1. ヒアルロニダーゼによる処理条件。

関節液 0.5 ml について、37°C でヒアルロニダーゼの添加量およびインキュベーション時間の検討を行った結果、添加量は 50 u/ml 以上、インキュベーション時間は 20分間以上で、いずれも吸光度は一定となった (Fig. 1)。そこで、関節液 0.5 ml にヒアルロニダーゼ (50 u/ml) 1 ml を加えて、37°C でインキュベーション時間 20分間を処理条件とした。

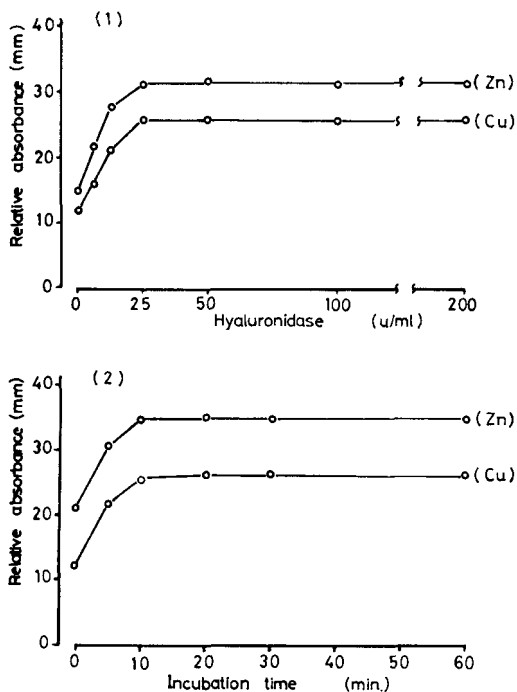


Fig. 1. Pretreatment of synovial fluid with hyaluronidase.
 (1) Effect of hyaluronidase treatment on the determination of copper and zinc in synovial fluid.
 (2) Effect of incubation time on the determination of copper and zinc in synovial fluid.

3-2. 希釈試験

関節液をヒアルロニダーゼ処理後、蒸留水で試料量に対して3~10倍まで希釈した時の、吸光度の変化について検討した (Fig. 2)。希釈倍数と吸光度の間には4~5倍希釈以上で Cu, Zn 両元素いずれも直線性が認められたので、5倍希釈を採用した。

3-3. 標準溶液の調製

標準溶液のバーナーへの吸引量補正は、グリセリンを用いて行った。即ち、10試料の関節液についてヒアルロニダーゼ処理後5倍希釈し、25°C下で測定試料1mlの吸引時間(秒)を計測し、1分間当りの吸引量を算出したところ5.21±0.11 (S.D.) ml/min., Range 5.04~5.36 ml/min.であった (Table 2)。グリセリン溶液の0~20v/v%濃度について、関節液と同条件下で吸引量を求めた (Fig. 3)。以上の成績から、関節液の測定用試料の吸引量はグリセリン濃度約4v/v%に相当するこ

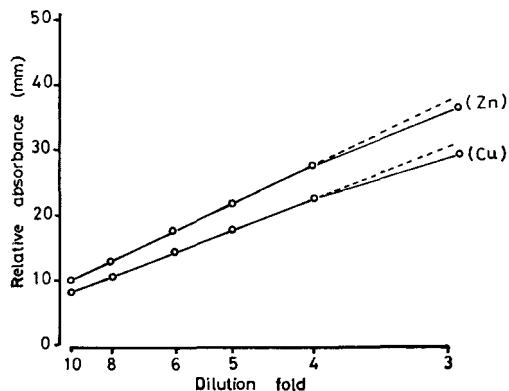


Fig. 2. Relation between absorbance and dilution fold of copper and zinc in synovial fluid after the pretreatment with hyaluronidase.

Table 2. Flow rate of samples into the burner.

No.	Flow rate (ml/min)
1	5.04
2	5.36
3	5.26
4	5.08
5	5.08
6	5.36
7	5.26
8	5.26
9	5.17
10	5.26
Mean	5.21
S.D.	0.11
Range	5.04~5.36

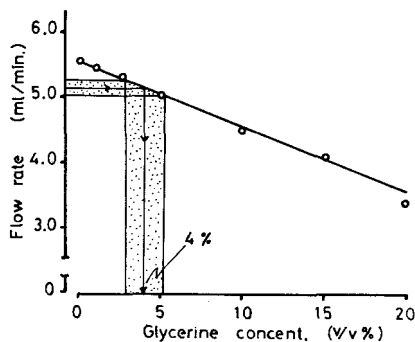


Fig. 3. Effect of glycerine concentration on the flow rate into the burner.

とが認められた。そこで、Cu, Zn 両元素とも20 v/v % のグリセリンを含むように保存用標準溶液50 $\mu\text{g}/100\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/100\text{ml}$, 200 $\mu\text{g}/100\text{ml}$, 300 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ を調製し、測定時に蒸留水で5倍希釈し測定用標準溶液とした。ブランクは20 v/v % グリセリン溶液を5倍希釈した。なお、標準曲線は0~300 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ の範囲ではCu, Zn 両元素とも直線性が認められた (Fig. 4)。

3-4. 測定時における溶液温度の影響

関節液 (ヒアルロニダーゼ処理後5倍希釈した溶液) および測定用標準溶液について4 $^{\circ}\text{C}$, 16 $^{\circ}\text{C}$, 30 $^{\circ}\text{C}$, 40 $^{\circ}\text{C}$ において、各々の吸光度を測定した (Fig. 5)。

各溶液は温度の上昇に伴い、いずれも吸光度は増加した。しかし、各温度における関節液中Cu, Zn濃度を算出したところ、30 $^{\circ}\text{C}$ までは測定値に大きな影響は認められなかった (Table 3)。

3-5. 回収試験

ヒアルロニダーゼ処理した関節液に、CuあるいはZnを50 $\mu\text{g}/100\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 添加した時の回収率について検討した (Table 4)。Cuでは98.6~106.8%

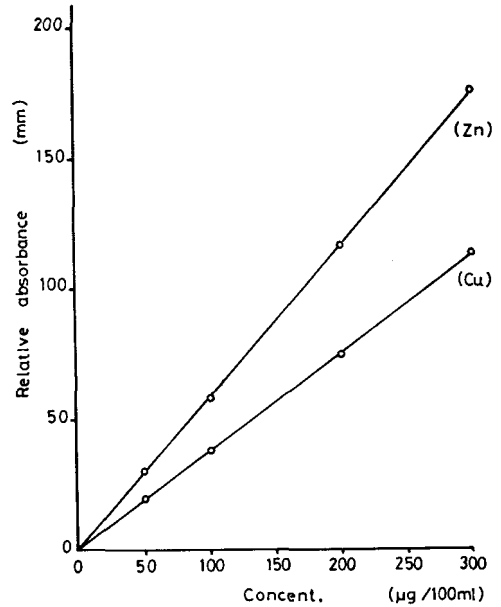


Fig. 4. Calibration curves for copper and zinc.

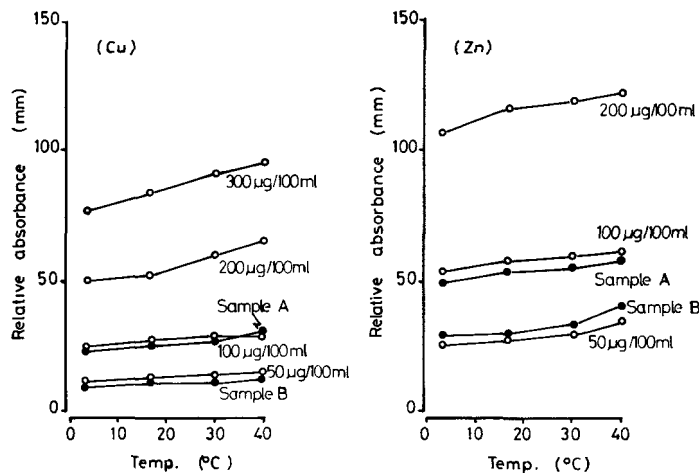


Fig. 5. Effect of solution temperature on the relative absorbance. —○—: Standard soln. —●—: Sample of synovial fluid.

Table 3. Influences of solution temperature on the determination of copper and zinc in synovial fluids.

		Temperature ($^{\circ}\text{C}$)			
Sample		4	16	30	40
Copper	(A)	94.2	96.4	96.0	100.8
	(B)	39.3	39.3	39.8	40.9
Zinc	(A)	93.4	92.9	92.8	94.1
	(B)	59.4	57.4	57.2	59.7

Table 4. Recovery rate of copper and zinc added to synovial fluid.

No.	Copper in synovial fluid ($\mu\text{g}/100\text{ml}$)	Copper ($\mu\text{g}/100\text{ml}$)		Recovery (%)	Zinc in synovial fluid ($\mu\text{g}/100\text{ml}$)	Zinc ($\mu\text{g}/100\text{ml}$)		Recovery (%)
		Added	Found			Added	Found	
1	106.9	50.0	160.3	106.8	49.3	50.0	102.9	107.2
2	90.4	50.0	139.7	98.6	47.1	50.0	97.5	100.8
3	80.1	50.0	129.4	98.6	42.9	50.0	92.1	98.4
4	73.9	50.0	125.4	103.0	56.8	50.0	105.0	96.4
5	63.7	100.0	166.5	102.8	57.9	100.0	158.6	100.7
6	90.4	100.0	192.8	102.8	67.8	100.0	171.5	102.8
7	111.0	100.0	213.7	102.7	109.3	100.0	216.4	107.1
8	78.1	100.0	178.8	100.7	90.0	100.0	191.8	101.8
Mean (%)				102.0				101.9
Range (%)				98.6 106.8				96.4 107.2

Table 5 Reproducibility of the determination of copper and zinc in synovial fluids.

No.	Copper in synovial fluid ($\mu\text{g}/100\text{ml}$)			Zinc in synovial fluid ($\mu\text{g}/100\text{ml}$)		
	Sample 1.	Sample 2.	Sample 3.	Sample 1.	Sample 2.	Sample 3.
1	97.2	111.1	138.9	49.6	99.2	111.6
2	97.2	106.5	134.3	49.6	94.2	114.1
3	101.9	113.4	134.3	52.1	99.2	116.6
4	106.5	115.8	132.0	54.6	96.7	119.0
5	101.9	111.1	129.6	49.6	95.5	116.6
6	101.9	111.1	134.4	55.8	94.2	119.0
7	101.9	113.4	134.3	54.6	96.2	119.0
8	97.2	111.1	134.3	55.8	95.5	115.3
9	101.9	113.4	129.6	54.6	94.2	116.6
10	106.5	111.1	129.6	54.6	91.8	114.1
Mean	101.4	111.8	133.1	53.1	95.7	116.2
S.D.	3.3	2.3	2.8	2.5	2.2	2.3
Range	97.2 106.5	106.5 115.8	129.6 138.9	49.6 55.8	91.8 99.2	111.6 119.0
C.V. (%)	3.3	2.1	2.8	4.7	2.3	2.0

S.D. : Standard Deviation.

C.V. : Coefficient of Variation.

平均102.0%, Znでは96.4~107.2%, 平均101.9%であった。

3-6. 再現性について

関節液3試料について, Cu, Znを各々10回連続測定した時の再現性について検討した (Table 5). 変動係数 (C.V.) はCuでは2.1~3.3%, Znでは2.0~4.7%であった。

3-7. 本法 (ヒアルロニダーゼ処理法) と灰化処理法の比較

関節液31試料について, 本法 (ヒアルロニダーゼ処理法) および灰化処理法 (低温灰化法—IPC 1003型低温灰化装置により出力150W, 酸素流量 150 ml/min; 4時間) で前処理し測定した時のCu, Zn各々について両処理法による測定値の相関性について検討した (Fig. 6).

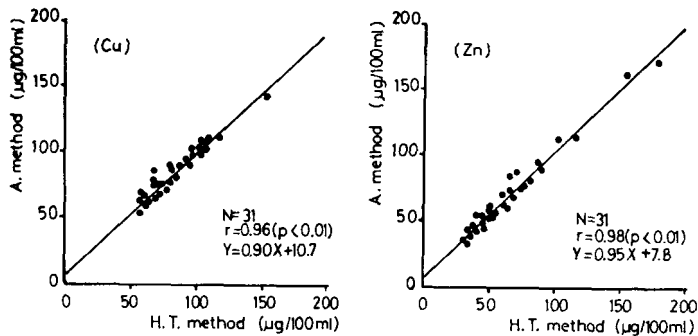


Fig. 6. Correlation of pretreatment between hyaluronidase treated method (H.T. method) and ashing method (A. method) on the determination of copper and zinc in synovial fluids.

Cu, Zn 両方法による測定値の間には、それぞれ Cu ; $r=0.96$ ($p<0.01$) Zn ; $r=0.98$ ($p<0.01$) と両元素とも良好な相関性が認められた。又、回帰直線は Cu ; $Y=0.90X+10.7$, Zn ; $Y=0.95X+7.8$ であった。

4. 測定方法 (関節液中 Cu・Zn の同時測定)

関節液0.5 ml をとり、ヒアルロニダーゼ (50 u/ml) 1 ml 加えて混和し、37°C で20分間インキュベーションし、次に蒸留水 1 ml を加えた。標準溶液およびブランク0.5 ml に蒸留水 2 ml を加えて、測定溶液 (試料および標準溶液) の温度を同一にした後 (室温で約30分間放置)、原子吸光分光光度計で吸光度を測定し、標準曲線より Cu, Zn 濃度を算定した。

5. 測定結果

5-1. 慢性関節リウマチ (RA) : 関節液中の Cu は52例 (男性12例, 女性40例) の平均は 97.6 ± 29.0 (S.D.) $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ であった。男性12例では 97.3 ± 27.1 (S.D.) $\mu\text{g}/100\text{ ml}$, 女性40例では 97.7 ± 29.5 (S.D.) $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ で、女性が平均値で、やや高値を示したが、両者の間には有意差は認められなかった ($t=0.04 < t_{50} (0.05) = 2.01$)。

関節液中の Zn は、52例 (男性12例, 女性40例) の平均は 83.9 ± 40.1 (S.D.) $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ であった。男性12例では 78.7 ± 29.9 (S.D.) $\mu\text{g}/100\text{ ml}$, 女性40例では 85.5 ± 42.6 (S.D.) $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ で女性が、やや高値を示す傾向にあったが、有意差は認められなかった ($t=0.51 < t_{50} (0.05) = 2.01$, Table 6, Fig. 7)。

5-2. 変形性関節症 (OA) : 関節液中の Cu は53例 (男性14例, 女性39例) の平均は 46.9 ± 14.5 (S.D.) $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ であった。男性14例では 47.3 ± 9.7 (S.D.) $\mu\text{g}/100\text{ ml}$, 女性39例では 46.8 ± 15.8 (S.D.) $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ で、

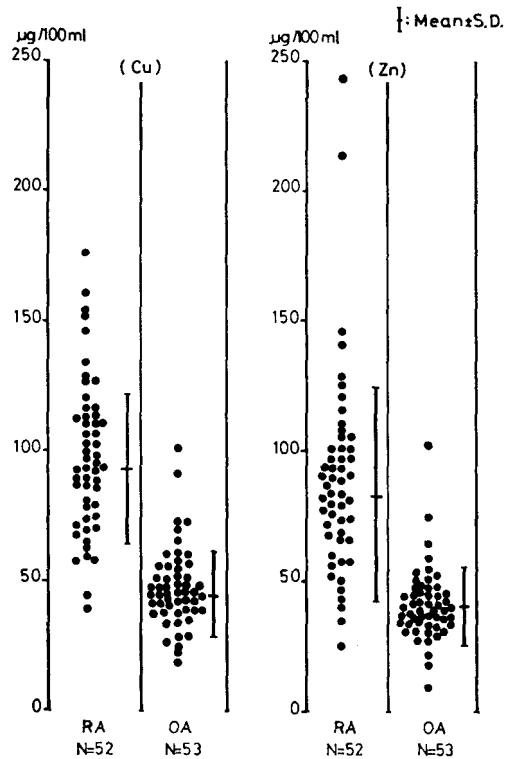


Fig. 7. Concentrations of copper and zinc in synovial fluids in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis.

男性が平均値でやや高値を示したが、両者の間には有意な差は認められなかった ($t=0.11 < t_{51} (0.05) = 2.01$)。

関節液中の Zn は、53例 (男性14例, 女性39例) の平均は 40.8 ± 14.3 (S.D.) $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ であった。男性14例では 45.1 ± 19.0 (S.D.) $\mu\text{g}/100\text{ ml}$, 女性39例では 39.3

± 11.8 (S.D.) $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ で、男性がやや高値を示す傾向にあったが、両者の間には有意差は認められなかった ($t=1.33 < t_{51}(0.05) = 2.01$, Table 6, Fig. 7).

5-3. 関節液中の Cu, Zn について RA と OA の比較
 関節液中の Cu は RA 52 例 (男性 12 例, 女性 40 例) と, OA 53 例 (男性 14 例, 女性 39 例) の比較では, RA は OA に比べ高値を示し, 両者の間には有意差 ($p < 0.001$)

Table 6. Concentrations of copper and zinc in synovial fluids in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis

	Sex	RA		OA		Compared with RA and OA	
			(N)		(N)	(t)	(p)
Cu	Total	97.6 \pm 29.0	52	46.9 \pm 14.5	53	11.36	$p < 0.001$
	Male	97.3 \pm 27.1	12	47.3 \pm 9.7	14	6.46	$p < 0.001$
	Female	97.7 \pm 29.5	40	46.8 \pm 15.8	39	9.52	$p < 0.001$
	Sex difference	(t) (p)	0.04 N.S.		0.11 N.S.		
Zn	Total	83.9 \pm 40.1	52	40.8 \pm 14.3	53	7.36	$p < 0.001$
	Male	78.7 \pm 29.9	12	45.1 \pm 19.0	14	3.47	$p < 0.005$
	Female	85.5 \pm 42.6	40	39.3 \pm 11.8	39	6.54	$p < 0.001$
	Sex difference	(t) (p)	0.51 N.S.		1.33 N.S.		

Values represented the concentrations of copper (Cu) and zinc (Zn) in synovial fluid, Mean \pm S.D. ($\mu\text{g}/100\text{ml}$). N.S. : Not significant. N : Number of individuals.

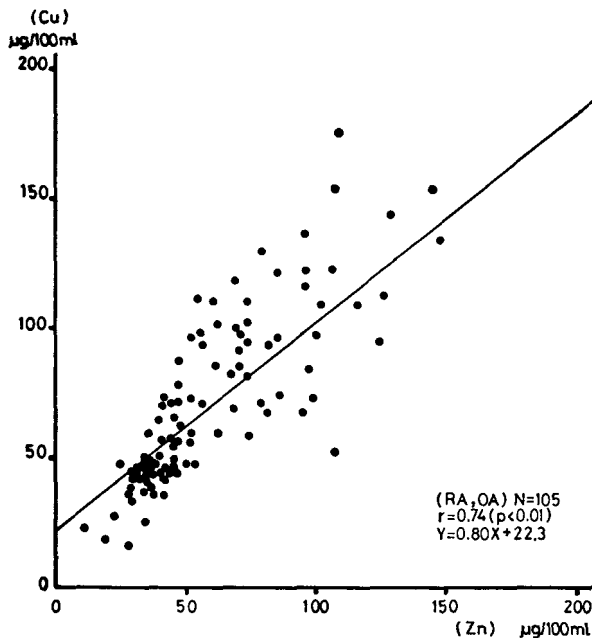


Fig. 8-a. Correlation between copper and zinc in synovial fluids in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis.

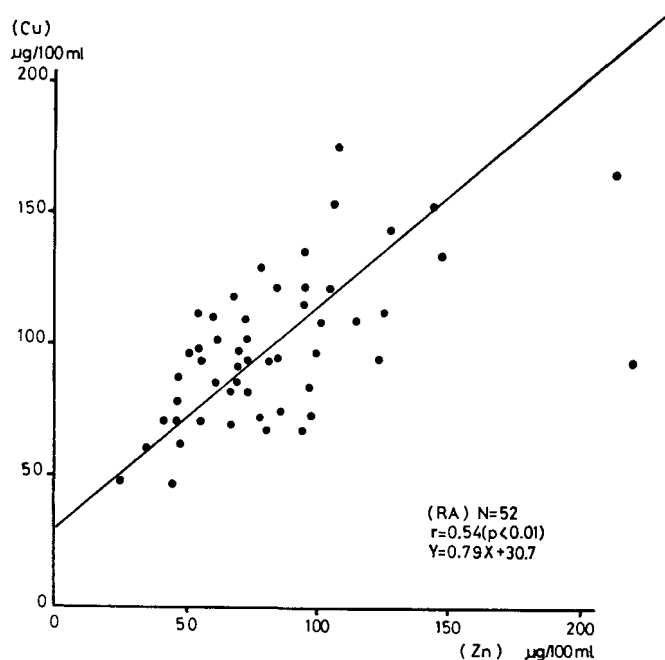


Fig. 8-b. Correlation between copper and zinc in synovial fluid in patients with rheumatoid arthritis.

が認められた ($t=11.36 > t_{103} (0.001) = 3.40$). 又, 男性および女性いずれも RA は OA に比べて高値を示し, 両者の間には有意な差 ($p < 0.001$) を認めた (男性: $t=6.46 > t_{24} (0.001) = 3.75$, 女性: $t=9.52 > t_{77} (0.001) = 3.47$).

関節液中の Zn は, RA 52例 (男性12例, 女性40例) と OA 53例 (男性14例, 女性39例) の比較では, RA は OA に比べ高値を示し, 両者の間には有意な差 ($p < 0.001$) が認められた ($t=7.36 > t_{103} (0.001) = 3.40$). 又, 男性および女性いずれも RA は OA に比べて高値を示し, 両者の間には有意な差 (男性: $p < 0.005$, 女性: $p < 0.001$) を認めた (男性: $t=3.47 > t_{24} (0.005) = 3.09$, 女性: $t=6.54 > t_{77} (0.001) = 3.47$, Table 6, Fig.7).

5-4. 関節液中の Cu, Zn の相関関係について

関節液中の Cu と Zn の相互関係を検討するため, 105例 (RA 52例, OA 53例) について相関係数を求めたところ $r=0.74$ ($p < 0.01$) と, 良好な正の相関関係が認められ, 回帰直線は $Y=0.80X+22.3$ であった. 又, RA (52例) および OA (53例) の相関係数は, それぞれ $r=0.54$ ($p < 0.01$), $r=0.81$ ($p < 0.01$) で, OA は RA に比べ高い相関性が認められた. 又, 回帰直線は, それぞれ $Y=0.79X+30.7$, $Y=0.82X+13.3$ であった (Fig.

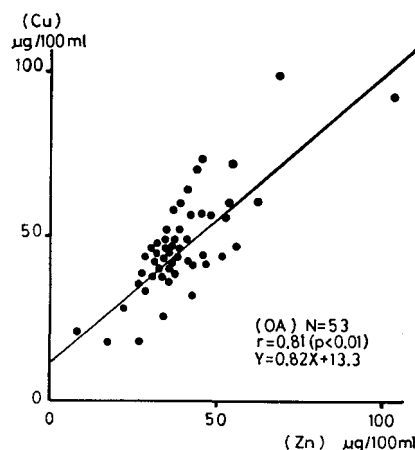


Fig. 8-c. Correlation between copper and zinc in synovial fluid in patients with osteoarthritis.

8-a, -b, -c).

5-5. RA の関節液中の Cu, Zn と Stage の関係

RA の関節液中の Cu, Zn と Stage の関係について検討を行った (Table 7, Fig. 9). Cu では Stage III でやや高値を示す傾向が窺われたが, いずれも Stage による濃度の有意な変動は認められなかった. Stage III

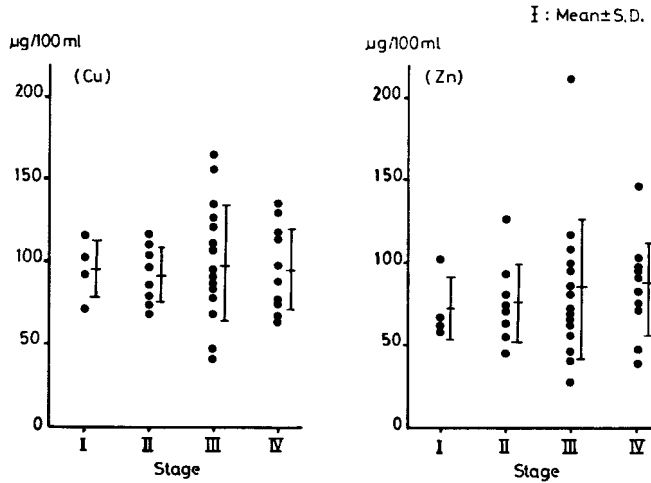


Fig. 9. Influences of stage on the concentrations of copper and zinc in synovial fluid in patients with rheumatoid arthritis.

Table 7. Influences of stage on the concentrations of copper and zinc in synovial fluid in patients with reumatoid arthritis.

	Stage			
	I	II	III	IV
(N)	4	8	15	10
Cu ($\mu\text{g}/100\text{ml}$)	96.1 ± 17.5	93.0 ± 16.3	98.7 ± 35.5	95.7 ± 24.6
C.V. (%)	18.2	17.5	36.1	25.7
Zn ($\mu\text{g}/100\text{ml}$)	72.9 ± 19.0	75.6 ± 23.6	84.4 ± 41.6	86.1 ± 28.5
C.V. (%)	26.1	31.2	49.3	33.1

Values represented concentrations of copper (Cu) and zinc (Zn) in synovial fluids (Mean \pm S.D.). C.V. : Coefficient of Variation N : Number of patients.

の変動は最大であった。

Zn では平均値でみると Stage の進行に伴って、Zn 濃度は高値を示す傾向にあったが、有意な変動とは言えなかった。Cu の場合と同様 Stage III で変動は最大であった。

6. 考按

6-1. 原子吸光分光分析法による血清 Cu, Zn の測定は共存元素や酸, などの化学的因子による影響が少ないので, この方法は高感度で特異性とともにも, 再現性にも優れている。すなわち血清を蒸留水で単純希釈するだけで簡便かつ迅速に直接測定ができるため, 臨床化学分析法としての有用性が高く評価されている (PRASAD 1965, ICHIDA 1969, 玉利 1971 FISHER 1976, 古野 1977)。

ヒアルロニダーゼで処理した関節液は, 血清の場合と同様に取り扱うことができる。すなわち, 試料 0.5 ml をヒアルロニダーゼ処理の後, 蒸留水で 5 倍希釈するだけで直接測定が行なえる。又, Cu, Zn 両元素の関節液内の含有量は標準曲線が直線を示す範囲内 (0 ~ 300 $\mu\text{g}/100\text{ml}$) で, 測定用ホローカソードランプと波長を変えるだけで, 両元素を同時測定することができた。

本法では測定用試料溶液の粘度の差は, パーナーへの吸引される試料量の差として測定値に影響するので, 標準溶液の粘度の補正が重要となる。そのために測定用試料の吸引量を示標とし, グリセリン溶液を用いて粘度補正を行なったところ, グリセリン濃度約 4 v/v % に相当することが認められたので, 標準溶液は測定時 (5 倍希釈時) 4 v/v % となる様に 20 v/v % グリセリン含有標準

溶液を調製した。測定溶液の温度上昇に伴う粘度の減少は、吸光度の増加として現われる。溶液の温度が30°C以下では、標準溶液と測定用試料溶液の温度を同一にすることによって、測定値への影響は少なくなる。回収率、再現性は良好であった。又、従来の灰化処理法と本法の間にはCu, Znともに良好な相関性が認められた。以上の点から、本測定法は関節液のCu, Znの臨床化学分析法として有用であると考えられる。

6-2. 関節液中Cu, Znについて

関節液の臨床化学的検索では、慢性関節リウマチ(RA)と変形性関節症(OA)についての報告が多い(猪狩1966, 業天1975, 松本1976, WHITE1978)。関節の滑膜組織中には、関節腔の近くまで毛細血管が分布しているため、その構成組織に病変が生じたとき、関節腔内にその反応としての関節液の貯溜が見られる。関節におけるRAとOAの病態の比較では、RAは炎症を、OAは退行変性を主体としたものであると理解されている(猪狩1966, 塩川1971, 藤本1976)。

関節液の成分は大部分が血漿成分の滲出したものと言われ(塩川1971)、関節液中の蛋白はRAでは健康人に比べて有意に増加し、OAではやや上昇傾向にあるが有意な差は認めえない(猪狩1966)、更に、関節液の蛋白分画は、RAは血清の場合と同様にアルブミン分画の低下と α_2 グロブリン、 γ グロブリン分画の増加が見られ、OAでは健康人の関節液の場合とほぼ同様であるが、 α_2 、 γ グロブリン分画がやや高値を示す傾向にあったという(猪狩1966, 畑下1967)。

NIEDERMEIER(1965, 1971)は、RA患者と関節に病変を持たない患者の死亡直後の関節液について、Cuを測定しRAでは有意に高値を示すことを認めた。WHITEら(1978)は、RAで、関節液中セルロプラスミン値の上昇を認めている。すなわち、RAに見られる関節液中のCuの高値は、滑膜の炎症により血管の透過性が亢進した結果、関節腔への血漿蛋白の滲出量が増加し、血清の場合と同様 α_2 グロブリン分画の上昇に伴うセルロプラスミン値の増加もその一因と推察できよう。

関節液中Znの測定に関する報告は少ない。NIEDERMEIERら(1971)は、関節液中のZnについてRA患者と、関節に病変を持たない患者の死亡直後の関節液中のZnを測定した結果、RAで有意な上昇が認められたと報告している。著者はRAとOAについて比較したが、RAで有意な高値が認められた。

RAとOAの関節液性状の著しい差異は、液中の浮遊細胞数である。池内(1975)はRAで 106.5×10^2 cells/mm³、OAで 5.8×10^2 cells/mm³を認め、塩川

(1974)はRAで 150×10^2 cells/mm³、OAで 10×10^2 cells/mm³であったと報告している。その浮遊細胞中には白血球が多く、白血球中のZnは土田(1971)によれば $152 + 44 \mu\text{g}/10^{10}$ cells、DENNESら(1961)では $140 + 19 \mu\text{g}/10^{10}$ cellsであったと言う。RAでの関節液中Znの高値は、蛋白濃度の上昇に加えて、白血球数の増加も関与するものと考えられる。

関節液中のCu, Zn両元素間の相関関係はRA, OAいずれも有意な正の相関関係が認められ、両者は平行した動態を示すことが窺われた。しかし、RAは血清の場合、血清Cuは上昇し、Znは低下しいずれも健康人に比べて有意な変動を示すことが確認されており(NIEDERMEIER1971, 古野1977)、血清、関節液中いずれもCuは高値であるのに対して、Znは血清で低下し、関節液中では高値を示している。このZnの変動の相違の成因については、炎症組織に取り込まれているのか、あるいは吸収、排泄系による変動であるのか、今後更に検討を必要とする課題である。

7. 結語

原子吸光分光光度計(日立207型)を使用し、関節液中のCu, Znの同時測定法の基礎的検討をした。また、慢性関節リウマチ患者52例(男性12例, 女性40例)、変形性関節症53例(男性14例, 女性39例)の関節液中のCu, Znの同時測定を行った。その成績は以下の如くである。

① 関節液の前処理は、関節液0.5 mlにヒアルロニダーゼ(50u/ml)1 mlを加え37°C, 20分間のインキュベーションで吸光度は一定となった。

② 関節液にヒアルロニダーゼ処理を行ない、蒸留水による5倍希釈液を用いた。その5倍希釈溶液のパーナーへの吸引量は、グリセリン4 v/v %水溶液に相当するので、標準溶液の粘度補正としてはCu, Zn両元素とも20 v/v %グリセリンを含むように調製し、測定時5倍希釈した。

③ 回収率はCuで102.0%, Znで101.9%であった。連続測定時の変動係数はCuで2.1~3.3%, Znで2.0~4.7%であった。

測定時の溶液の温度が4°C~30°Cの範囲以内であれば標準溶液と試料溶液の温度を同一に保つことにより測定値への影響はほとんど認められなかった。

④ 同一関節液について本法(ヒアルロニダーゼ処理法)と灰化法(低温灰化法)による方法の相関性について検討したところ、相関係数はCu, Znそれぞれ $r=0.96$ ($p<0.01$), $r=0.98$ ($p<0.01$)となり、回帰直線はそれぞれ $Y=0.90X+10.7$, $Y=0.95X+7.8$ で良好な相

関性が認められた。

⑤ RA 52例(男性12例, 女性40例)の関節液中のCu, Znはそれぞれ 97.6 ± 29.0 (S.D.) $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$, 83.9 ± 40.1 (S.D.) $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ であった。男性(12例)のCu, Znはそれぞれ 97.3 ± 27.1 (S.D.) $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$, 78.7 ± 29.9 (S.D.) $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ で, 女性(40例)のCu, Znはそれぞれ 97.7 ± 29.5 (S.D.) $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$, 85.5 ± 42.6 (S.D.) $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ 両元素とも性差は認められなかった。

⑥ OA 53例(男性14例, 女性39例)の関節液中のCu, Znはそれぞれ 46.9 ± 14.5 (S.D.) $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$, 40.8 ± 14.3 (S.D.) $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ であった。男性(14例)のCu, Znはそれぞれ 47.3 ± 9.7 (S.D.) $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$, 45.1 ± 19.0 (S.D.) $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ であった。女性(39例)のCu, Znはそれぞれ 46.8 ± 15.8 (S.D.) $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$, 39.3 ± 11.8 (S.D.) $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ で, 両元素とも性差は認められなかった。

また, Cu, Zn 両元素とも OA に比べ RA が有意 ($p < 0.005 \sim p < 0.001$) に高値を示した。

⑦ 関節液中のCuとZnの相関性について検討した結果, 相関係数はRA 52例, OA 53例, 計105例では $r = 0.74$ ($p < 0.01$) 回帰直線は $Y = 0.80X + 22.3$ であった。52例のRA, および53例のOAではそれぞれ $r = 0.54$ ($p < 0.01$), $r = 0.81$ ($p < 0.01$)となった。回帰直線はそれぞれ $Y = 0.79X + 30.7$, $Y = 0.82X + 13.3$ となった。

⑧ 関節液中のCu, ZnとRAのStageとの関係を調べた結果, Stageの進行に伴ってZnは上昇する傾向が窺われた。Cuでは変化が認められなかった。Stage IIIで, Cu, Znの測定値の変動が最大であった。

謝辞, 稿を了るにあたり, 関節液試料の収集に際しては, 種々の御指導ならびに御援助いただいた岡山大学温泉研究所, リハビリテーション部門の仲原泰博教授に深甚なる謝意を表したい。

8. 文 献

- DENNES, E., TUPPER, R., WORMALL, A. (1961) The zinc content of erythrocytes and leucocytes of blood from normal and leukaemic subjects. *Biochem. J.* **78**, 578-587.
- 藤本憲司, 田口靖夫 (1976) 変形性関節症の病理, 臨床整形外科, **11**, 36-48.
- FISHER, G.L., et al. (1976) Copper and zinc levels in serum from human patients with sarcoma. *Cancer*, **37**, 356-363.
- 古野勝志 (1977) 原子吸光分光分析法による血清中銅・亜鉛の同時測定について. 岡大温研報. **46**, 25-35.
- 業天洋三 (1975) 慢性関節リウマチの基礎的ならびに臨床的研究. 第1編. 末梢血, 関節液および滑膜における酵素学的考察. 岡山医学会誌, **87**, 835-852.
- 畑下敏行 (1967) 特殊な体液蛋白の電気泳動分析 (6), 関節液, 臨床病理, 特 **12**, 89-94.
- 猪狩 忠 (1966) 関節疾患と関節液. 医事新報. **2221** 29-34.
- ICHIDA, T., NOBUOKA, M. (1969) Determination of serum copper with atomic absorption spectrophotometry. *Clin. Chem. Acta.*, **24**, 299-303.
- 池内 宏 (1975) 関節液. 臨床検査, **19**, 1482-1483.
- 松本美富士, 加藤芳郎, 今泉 司 (1976) リウマチ様関節炎患者関節液中のモノアミノオキシダーゼ活性, 医学のあゆみ, **99**, 860-861.
- NIEDERMEIER, W. (1965) Concentration and chemical state of copper in synovial fluid and blood serum of patients with rheumatoid arthritis. *Ann. rheum. Dis.*, **24**, 544-548.
- NIEDERMEIER, W., GRIGGS, J. H. (1971) Trace metal composition of synovial fluid and blood serum of patients with rheumatoid arthritis. *J. Chron. Dis.*, **23**, 527-536.
- PRASAD, A. S., OBERLEAS, D., HALSTED, J. A. (1965) Determination of zinc in biological fluids by atomic absorption spectrophotometry in normal and cirrhotic subjects. *J. Lab. Clin. Med.*, **66**, 508-516.
- PRASAD, A. S. et al. (1976) Trace elements in sickle cell disease. *J.A.M.A.*, **235**, 2396-2398.
- 塩川優一 (1971) *目で見るリウマチ* 武田薬品
- 塩川優一 (1974) リウマチの診療, 一般医のために, 中外医学社, pp. 63-66.
- 玉利尚之 (1971) 諸種疾患患者の血漿亜鉛および銅に関する知見, ことに悪性腫瘍について 九州歯会誌, **24**, 612-648.
- 土田雅通 (1971) 癌患者の血中銅および亜鉛に関する研究, 第2報, 全血, 血漿, 赤血球ならびに白血球中銅ならびに亜鉛に関する知見, 殊に口腔癌および胃癌について. 九州歯会誌, **25**, 215-249.
- WHITE, A. G., et al (1978) Copper- An index of erosive activity. *Rheum. Rehabil.*, **17**, 3-5.

DETERMINATION OF COPPER AND ZINC IN SYNOVIAL FLUID BY ATOMIC ABSORPTION SPECTROPHOTOMETRY.

by Katsushi FURUNO (Director : H. MORINAGA)
Division of Medicine, Institute for Thermal Spring Research, Okayama University.

Abstract: Copper (Cu) and zinc (Zn) in synovial fluids of 52 patients with rheumatoid arthritis (RA) and of 53 patients with osteoarthritis (OA) were determined using a HITACHI MODEL 207 atomic absorption spectrophotometer. Standard solution of Cu and Zn were 50 μ g, 100 μ g, 200 μ g and 300 μ g per 100 ml in 20 v/v % glycerine containing 0.01 N-HCl.

To 0.5 ml synovial fluid, 50 units of hyaluronidase was added and then the mixture were incubated for 20 minutes at 37°C. Synovial fluid treated with hyaluronidase and standard solution of Cu and Zn were diluted five fold with deionized distillation water, then aspirated directly into the burner. The relative absorbance was expressed as scale reading by a HITACHI MODEL QPD-54 recoder. The mean recovery rate of Cu and Zn in synovial fluids were 102.0% and 101.9%.

By this method the concentrations of Cu and Zn in 52 RA (12 males, 40 females) were 97.6 \pm 29.0 (S.D.) μ g/100 ml and 83.9 \pm 40.1 (S.D.) μ g/100 ml; 97.3 \pm 27.1 (S.D.) μ g/100 ml, 78.7 \pm 29.9 (S.D.) μ g/100 ml in 12 males and 97.7 \pm 29.5 (S.D.) μ g/100 ml, 85.5 \pm 42.6 (S.D.) μ g/100 ml in 40 females respectively. The concentrations of Cu and Zn in 53 OA (14 males, 39 females) were 46.9 \pm 14.5 (S.D.) μ g/100 ml and 40.8 \pm 14.3 (S.D.) μ g/100 ml; 47.3 \pm 9.7 (S.D.) μ g/100 ml, 45.1 \pm 19.0 (S.D.) μ g/100 ml in 14 males and 46.8 \pm 15.8 (S.D.) μ g/100 ml, 39.3 \pm 11.8 (S.D.) μ g/100 ml in 39 females respectively.

No sex differences of Cu and Zn values were observed in both RA and OA.

In patients with RA, concentrations of Cu and Zn in synovial fluids were significantly higher than in OA in both sexes. There were positive correlation between the concentrations of Cu and Zn in 105 patients (RA and OA, $r=0.74$, $p<0.01$), in 52 RA ($r=0.54$, $p<0.01$), in 53 OA ($r=0.81$, $p<0.01$).

In patients with RA, there were no correlation between stage and concentrations of Cu and Zn in synovial fluids.