

滑膜細胞は恒にgp130を発現しているが、IL-6Rに関してはフローサイトメトリーでは検出感度以下であった。また培養上清中のsIL-6Rは感度以下であった。一方、RT-PCR法では、多発性骨髄腫細胞株U266に比べ約100分の1の量の膜型IL-6Rの発現が認められると同時に、さらに極少量のalternative splicingにより膜結合部位を欠失したsIL-6RのmRNAが検出された。

2 IL-6/sIL-6Rによる滑膜細胞増殖抑制

IL-6はsIL-6Rの存在下でのみ、RA患者由来滑膜細胞の増殖を濃度依存的に抑制し、TNF α による増殖刺激作用と拮抗した。さらにTNF α の存在下では滑膜細胞からのIL-6の産生が誘導され、この内因性IL-6は、sIL-6Rの存在下で、TNF α によって誘導される滑膜増殖を抑制した。

3 SCID-HuRAモデルによる治療実験

SCIDマウス背筋内に、RA患者の罹患関節組織を移植して作成したヒトRAのモデルマウスに、抗IL-6R抗体を投与し治療実験を行った。その結果、100 μ g/匹の抗IL-6R抗体腹腔内単回投与により単核球を中心とする炎症性細胞の浸潤は消失した。また1週間に1度計4回の抗体投与によりコントロール抗体あるいはオーラノフィン投与群に比べ関節滑膜の重量は約1/2に減少した。さらに破骨細胞と思われるTRAP陽性の細胞も約1/2に減少していた。またMMP1およびMMP9の陽性細胞も減少していた。

4 サイトカインシグナル伝達分子であるSTAT familyに共通のSH2ドメインに対するモノクローナル抗体を用いて、SH2ドメインを有する分子SSI-1分子をクローニングした。この分子はIL-6によりSTAT3のリン酸化を介して誘導され、且つJAKに結合し、JAKの機能阻害を介してIL-6シグナル伝達を抑制するIL-6のネガティブフィードバック分子であることを明らかにした。この分子の遺伝子導入によりIL-6によるマウス前骨髄性白血病細胞株であるM1細胞の分化とアポトーシスの誘導は完全に抑制され、IL-6のシグナルを阻害する実際の機能分子であることがわかった。

またこの分子には構造上の相同性を有するファミリー分子がSSI-1も含めて8種類存在する。そこでヒトで報告されている5種類のSSIファミリー分子についてRT-PCRによる発現の検出を試みた。3-9世代のRA患者由来滑膜細胞は無刺激の状態でもSSI-1、2、3、4、6、分子をわずかに発現していることがわかった。sIL-6Rの存在下では、IL-6刺激後約30分から60分でSTAT1とSTAT3のリン酸化が認められ、さらに、60分から120分をピークとするSSI-1とSSI-3の一過性の発現増強が確認された。しかし、SSI-2、4、6に関してはIL-6/sIL-6Rの刺激による発現の増強は認められなかった。このことから、SSI-1、と3がマウスと同様にヒトにおいてもIL-6シグナルネガティブフィードバックに関与する可能性が示唆された。

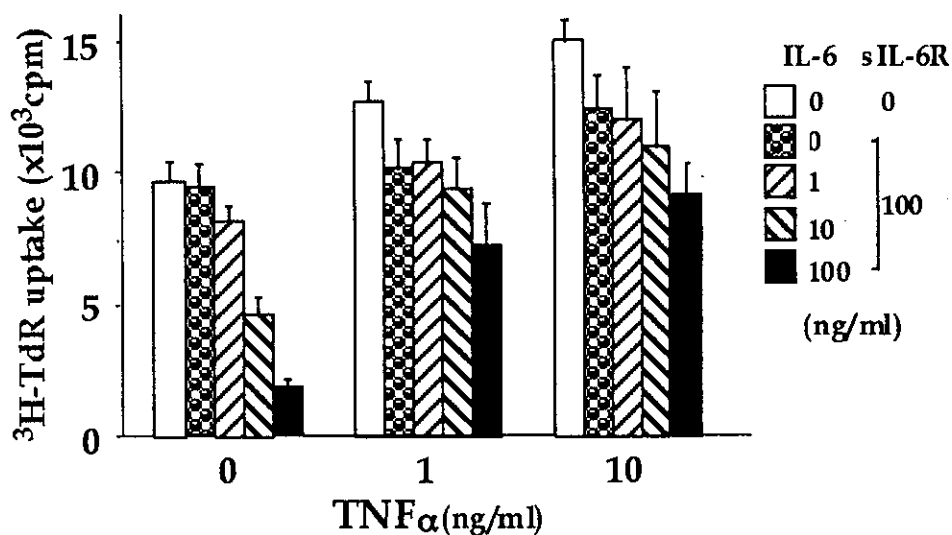


図1 IL-6はsIL-6Rの存在下で滑膜細胞の増殖を抑制し、TNF α による増殖刺激と拮抗する。

D. 考察

IL-6シグナル伝達阻害による治療効果は滑膜細胞に対する直接的な増殖抑制によるのではなく、単核球を中心とする炎症性細胞の浸潤の阻止や、破骨細胞の分化の阻止またマトリックスメタロプロテアーゼの抑制によると考えられる。滑膜細胞に対しては逆に、TNF α によりIL-6の産生が誘導され、そのIL-6が、sIL-6Rの存在下でTNF α による滑膜増殖刺激を抑制したことから、IL-6はTNF α による増殖刺激に対するネガティブフィードバック因子として働いている可能性が示唆された。すなわち、IL-6阻害治療においては標的細胞を選ぶことにより、より有効な治療効果が得られると考えられる。

またIL-6のネガティブフィードバック因子であるSSI-1及びそのファミリー分子のうちSSI-1とSSI-3がヒト滑膜細胞におけるIL-6シグナルに関与すると与えられた。この分子の働きを明らかにすることでRAにおける炎症の機序、IL-6の作用の過剰といった免疫調節異常を明らかにできる可能性が示唆された。

E. 結論

サイトカイン阻害治療においては標的臓器、標的細胞を特異的に選択することにより、より有効な治療を確立することが可能である。自己免疫反応の成立におけるIL-6の標的を明らかにすることにより真の早期治療の指針が確立できると思われる。

また、SSI-1又はSSI-3の遺伝子の発現制御によるRAの治療の可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kondoh H, Yoshizaki K, Nishimoto N, Kishimoto T, Nakamura h, Nishimura T: Bone marrow uptake of Ga-67 on Castleman's disease and correlation with high level of interleukin-6. *J. Nucl. Med* , 1999 in press
2. Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T: Anticytokine therapy in autoimmune diseases. *Internal Medicine* , 1999 in press
3. 西本憲弘, 松本智成, 吉崎和幸: 抗サイトカイン療法. *カレントセラピー* 17:150-154, 1999
4. Takagi N, M. Mihara, Y. Moriya, N. Nishimoto, K. Yoshizaki, T. Kishimoto, Y. Takeda, Ohsugi Y: Blockage of Interleukin-6 receptor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 41:2117-2121, 1998
5. Matsuno H, Sawai T, Nezuka T, Uzuki M, Tsuji H, Nishimoto N, Yoshizaki K: Treatment of rheumatoid synovitis with anti-reshaping human interleukin-6 receptor monoclonal antibody -use of Rheumatoid Arthritis tissues implants in the SCID mouse model. *Arthritis Rheum* 41:2014-2021, 1998
6. Johkoh T, N. L. Müller, K. Ichikado, N. Nishimoto, K. Yoshizaki, O. Honda, N. Tomiyama, H. Naitoh, H. Nakamura, Yamamoto S: Intrathoracic multicentric castlemans disease: CT findings in 12 patient. *Radiology* 209:477-481, 1998
7. Isumi Y, N. Minamino, A. Kubo, N. Nishimoto, K. Yoshizaki, M. Yoshioka, K. Kangawa, Matuso H: Adrenomedullin stimulates IL-6 production in Swiss 3T3 cells. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 244:325-331, 1998
8. Yoshizaki K, Nishimoto N, Mihara M, Kishimoto T: Therapy of RA by blocking IL-6 signal transduction with humanized anti-IL-6 receptor antibody. *Springer Seminars in immunopathology* 20:247-259, 1998
9. 西本憲弘, 吉崎和幸, 岸本忠三: 抗IL-6抗体による骨髓腫細胞の増殖制御. *臨床検査* 42:86-89, 1998
10. 西本憲弘, 吉崎和幸: 慢性関節リウマチの抗IL-6レセプター抗体療法. *リウマチ科* 19:399-402, 1998
11. 西本憲弘, 吉崎和幸: サイトカインとサイトカインレセプター. *臨床免疫* 30:1370-1375, 1998
12. 吉崎和幸, 西本憲弘: 骨融解像. *Molecular Medicine臨時増刊号 症候・病態のメカニズム* 35:263-264, 1998
13. 吉崎和幸, 西本憲弘, 田合ひろみ, 松本智成:

- ヒト型化抗IL-6レセプター抗体を用いたIL-6シグナル伝達阻害によるキャスルマン病の治療への応用. 炎症 18:319-326, 1998
14. 西本憲弘, 松本智成, 吉崎和幸: 抗サイトカイン療法. カレントセラピー 17:150-154, 1998
 15. 西本憲弘, 吉崎和幸, 岸本忠三: サイトカインシグナル伝達阻害による自己免疫疾患の治療. 日本内科学会雑誌 87:1745-1750, 1998
 16. 西本憲弘, 吉崎和幸: 抗サイトカイン療法とその有用性. Medical Practice 15:2105-2108, 1998
 17. 伊藤愛, 田合ひろみ, 西本憲弘, 吉崎和幸: RAの先進医療～IL-6レセプターを阻害する治療法～. RA&セラピー 4:42-51, 1998
 18. 伊藤愛, 西本憲弘, 團野典行, 大野美夏, 吉崎和幸: インターロイキン6の病態における役割と治療への応用. Cardiologist 3:113-119, 1998
 19. 吉崎和幸, 西本憲弘: ヒト型化抗IL-6レセプター抗体によるキャスルマン氏病の治療. 感染・炎症・免疫 28:42-43, 1998
 20. 西本憲弘, 吉崎和幸: 抗サイトカイン療法とその有用性. Medical Practice 15(12): 2105-2108, 1999
- 2.学会発表
1. N.Nishimoto, A. Ito, M. Ono, H. Tagoh, H. Matsuno, T. Tomita, T. Ochi, T. Kishimoto, K. Yoshizaki: Anti-interleukin-6 receptor therapy of rheumatoid arthritis. 第28回日本免疫学会総会. 12/2-4, 1998 (神戸)
 2. 伊藤愛、西本憲弘、大野美夏、田合ひろみ、富田哲也、越智隆弘、吉崎和幸：IL-6/sIL-6R複合体によるRA由来滑膜細胞の増殖抑制作用。第28回日本免疫学会総会。12/2-4, 1998 (神戸)
 3. 伊藤愛、西本憲弘、團野典行、大野美夏、富田哲也、越智隆弘、吉崎和幸：RA滑膜細胞増殖に対するTNF α とIL-6の相反する作用。第42回日本リウマチ学会総会。5/7-9, 1998 (東京)

カルパイン阻害薬によるラットコラーゲン誘発関節炎の治療の試み

三森経世¹, 野島崇樹¹, 藤井隆夫¹, 諏訪 昭¹, 平形道人¹, 大曾根康夫²,
高木聡希³, 高田 功³

慶應義塾大学医学部内科¹, 川崎市立川崎病院内科²,
田辺製薬医薬育成研究所³

研究要旨

我々はこれまでにカルパイン（カルシウム依存性システインプロテアーゼ）の特異阻害蛋白であるカルパスタチンに対する自己抗体が慢性関節リウマチ（RA）をはじめとするリウマチ疾患に検出されることを報告してきた。カルパインは軟骨破壊や炎症の惹起に関与する中性プロテアーゼの一種と考えられるため、その阻害蛋白であるカルパスタチンに対する自己抗体の存在は RA の病態に関与する可能性が示唆される。そこでカルパイン活性の抑制が RA における新たな早期治療となる可能性を想定し、RA モデル動物であるコラーゲン誘発ラット関節炎のカルパイン阻害薬による治療を試みた。種々のカルパイン阻害物質（カルパスタチンペプチド、ロイペプチン、カルペプチン、E-64-d）を II 型コラーゲン感作ラットに投与し、関節炎発症に与える影響を検討したところ、カルペプチン投与ラットにのみ関節炎発症の有意の抑制効果が認められた。

A. 研究目的

我々はこれまでにカルパイン（カルシウム依存性システインプロテアーゼ）の特異阻害蛋白であるカルパスタチンに対する自己抗体が慢性関節リウマチ（RA）をはじめとするリウマチ疾患に検出されることを報告してきた。カルパインは軟骨破壊や炎症の惹起に関与する中性プロテアーゼの一種と考えられるため、その阻害蛋白であるカルパスタチンに対する自己抗体の存在は RA の病態に関与する可能性が示唆される。事実、RA 患者の滑膜や関節液中にはカルパインが増加しているとの報告もある。このような背景から、我々はカルパイン活性の抑制が RA における新たな早期治療となる可能性を想定し、本研究で RA モデル動物であるコラーゲン感作ラットにカルパイン阻害薬を投与し、関節炎発症における抑制効果を検討した。

B. 方法

1. 材料：ラットカルパスタチンペプチド（ドメイン IV のカルパイン結合部位を含む合成 27 アミノ酸：EKIKAEHSEKLGERRDDTIPPEYRHLDD）

（2mg/kg）、ロイペプチン（3mg/kg、ペプチド研）、カルペプチン（3mg/kg、Tocris Cookson Inc.）、E-64-d（3mg/kg、ペプチド研）、および対照薬剤としてデキサメサゾン（0.1mg/kg）を用いた。カルパスタチンペプチドは生理食塩水、ロイペプチン、カルペプチン、E-64-d は 15% DMSO、デキサメサゾンは蒸留水に溶解した。

2. II 型コラーゲンによるラット関節炎の作成：Lewis 系ラット（7 週齢）にウシ II 型コラーゲン（1.5mg/ml）と Complete Freund Adjuvant の超音波エマルジョンを 100μl ずつ 10 カ所、計 1ml を皮下注射（1 群 5 匹）、10 日目に 100μl を追加免疫した。対照群にはコラーゲンの代わりに 0.05M 酢酸を同量用いたエマルジョンを作成して使用した。経時的に後肢の足容積をプレシスモメーターで測定し、関節炎の指標とした。プロテアーゼインヒビターは 0 日目より 21 日目まで上記の用量で 1 日 1 回腹腔内投与した。

C. 結果

II 型コラーゲン免疫ラットは 12 日目より関節炎を発症し、14 日目には全例で関節炎が認めら

れた。まず、カルパスタチンペプチド (2mg/kg) を投与したが、0-21 日までの毎日投与、12-21 日までの毎日投与いずれの投与方法でも、関節炎の抑制効果は認められなかった。これに対して、デキサメサゾン投与ラットはほぼ完全に関節炎を抑制した (図1)。

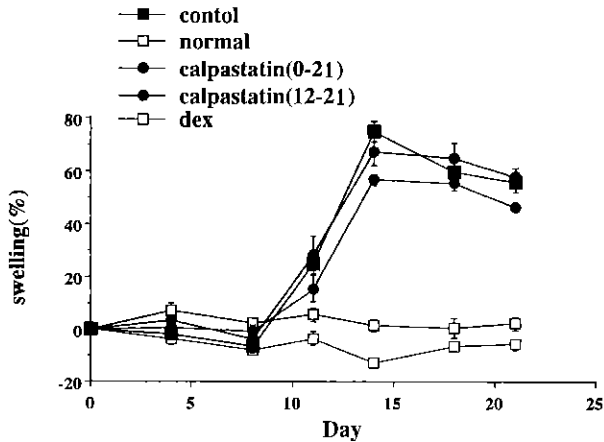


図1. II型コラーゲン誘発ラット関節炎に対するカルパスタチンペプチドの効果

そこで、次により低分子プロテアーゼインヒビターであるロイペプチン (3mg/kg), カルペプチン (3mg/kg), E-64-d (3mg/kg) で検討した。カルペプチンを毎日投与したラットでは、後肢足浮腫の発現は有意に減少しており (13 日目 64%, 17 日目 50%, 21 日目 30%抑制), 関節炎発症の抑制効果が確認された。これに対し、ロイペプチンおよび E-64-d 投与ラットでは、有意の関節炎の抑制効果は認められなかった (図2)。また、組織像においてもカルペプチン投与ラットでは炎症細胞浸潤や骨軟骨破壊の程度が、デキサメサゾンの効果には及ばないものの、対照ラットに比して軽度であった (図3)。

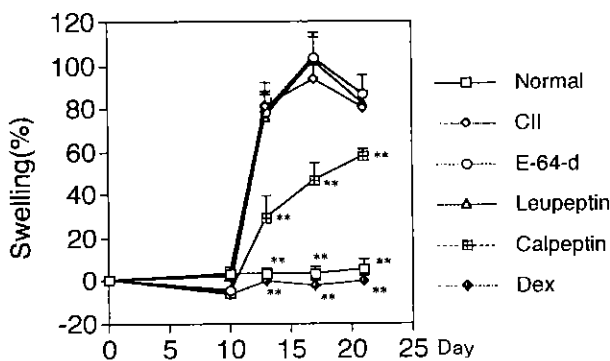


図2. II型コラーゲン誘発ラット関節炎に対するカルパイン阻害薬の効果

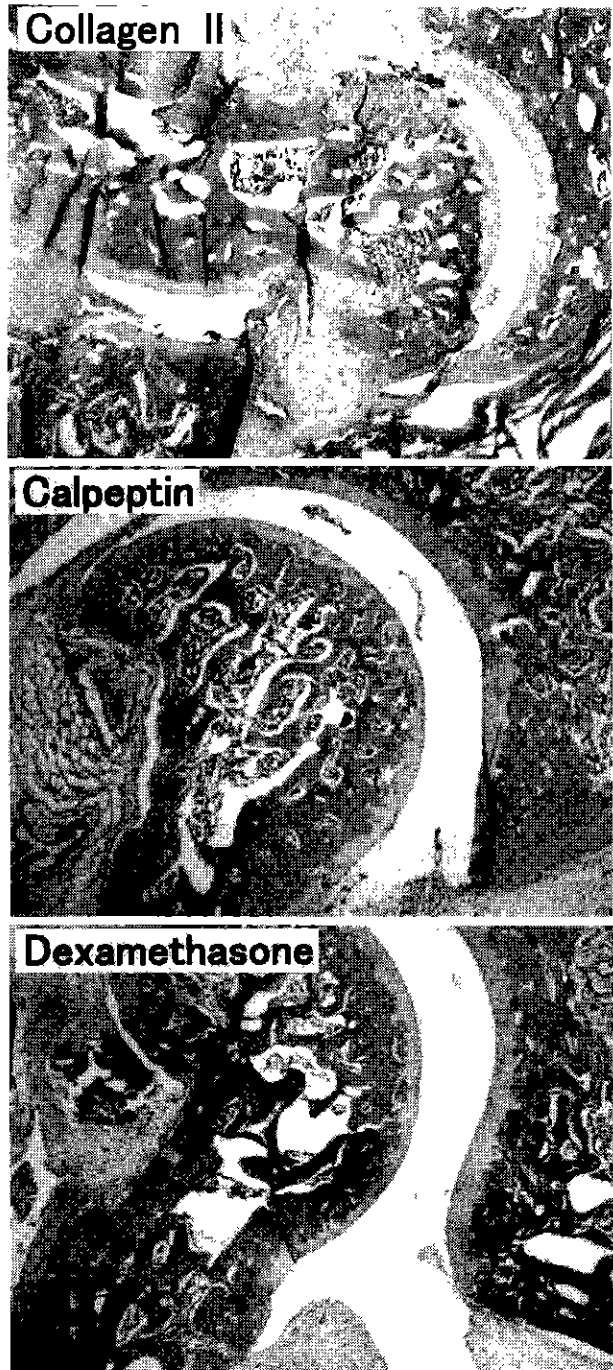


図3. II型コラーゲン感作ラットとカルペプチン投与ラットにおける関節炎組織像の比較

D. 考察

我々は RA に出現する新たな自己抗体を見だし、その対応抗原遺伝子のクローニングにより、カルシウム依存性中性プロテアーゼ (カルパイン) に特異的な内在性阻害蛋白であるカルパスタチンであることを報告してきた。カルパスタチンは L, I~IV の5つのドメインから構成され、ド

メイン I ~ IV に共通の領域 (TIPXYR) がカルパイン結合部位と考えられており、それぞれがカルパイン阻害活性を持つ。

カルパインは RA 患者の滑膜や関節液中に増加し、RA の関節破壊に関与するという証拠がある。カルパインは、IL-1 α の活性化と分泌、白血球遊走活性の誘導、プロテインキナーゼ C 活性化などを通じて炎症の惹起に関与する可能性があり、また軟骨基質プロテオグリカンを分解すると報告されている。したがって、RA 患者血清中の抗カルパスタチン抗体がカルパスタチン活性を抑制するならば、カルパインを相対的に上昇させ、RA の発症や進展に関与する可能性がある。我々は、抗カルパスタチン抗体陽性 RA 患者 IgG がカルパスタチン活性を抑制してカルパイン活性を上昇させることを見だし、カルパスタチンに対する自己抗体の産生が RA の病態と深く関与する可能性を示唆した。このような背景から、我々はカルパイン活性の抑制が RA における新たな早期治療となる可能性を想定し、RA モデル動物であるコラーゲン誘発ラット関節炎のカルパイン阻害薬による治療を試みた。

種々のカルパイン阻害物質 (カルパスタチンペプチド、ロイペプチン、カルペプチン、E-64-d) を II 型コラーゲン感作ラットに投与し、関節炎発症に与える影響を検討したところ、カルペプチンを毎日投与したラットでは、後肢足浮腫の発現が有意に減少し、関節炎発症の抑制効果が認められた。これに対し、他のインヒビターでは有意の関節炎抑制効果は認められなかった。カルペプチンのみが効果を示した理由はなお不明であるが、1) カルパスタチンペプチド (27 アミノ酸) は分子が大きすぎて関節局所へ届かずに代謝された可能性があること、2) 3 種類の小分子インヒビターの中では、カルペプチンが最も強い *in vitro* カルパイン抑制作用を持つことより、関節局所でカルペプチンのみが十分な有効濃度を保ち得た可能性が高い。しかし、カルペプチンはカルシウム依存性システインプロテアーゼに共通するインヒビターであるため、カルパイン以外のカテプシンなどのシステインプロテアーゼを同時に阻害することによって、関節炎の発症が抑えられた可能性も否定できない。

今回の成績は濃度を 1 用量しか用いていない予備的研究の段階であるが、カルパイン阻害薬が関節炎の治療に用いられうる可能性を示した初めての成績である。今後、用量設定、毒性試験、他のインヒビターの効果など、さらに検討を進める予定である。

E. 結 論

種々のカルパイン阻害物質を II 型コラーゲン感作ラットに投与し、カルペプチンに有意の関節炎抑制効果が認められた。カルパイン阻害薬が RA の治療薬として利用される可能性が初めて示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mimori T et al : Autoantibodies to calpastatin (an endogenous inhibitor for calcium-dependent neutral protease, calpain) in systemic rheumatic diseases. Proc Natl Acad Sci USA 92 :7267-7271, 1995
- 2) 安岡秀剛, 三森経世ほか : リウマチ疾患における抗カルパスタチン抗体の認識する自己抗原エピトープとその臨床的意義に関する研究. リウマチ 37:458-466, 1997
- 3) 三森経世 : 抗カルパスタチン抗体. 臨床検査 41:584-585, 1997
- 4) 高田理絵, 三森経世ほか : 加熱処理 HeLa 細胞抽出物を抗原とした, 免疫プロット法によるリウマチ疾患患者血清中の免疫グロブリンクラス別抗カルパスタチン抗体の検出. 日本免疫学会雑誌 21:150-158, 1998
- 5) Kanazawa Y, Mimori T et al: Domain reactivity of autoantibodies to calpastatin in patients with systemic rheumatic diseases. Arthritis Rheum (投稿中)

2. 学会発表

- 1) Kaneshiro Y, Mimori T et al: Molecular cloning of full-length cDNA encoding human calpastatin and analysis of epitopes recognized by anti-calpastatin autoantibodies in patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 39:S38, 1996
- 2) Matsumoto M, Mimori T et al: Inhibition of calpastatin function by autoantibodies in patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 40:S277, 1997

MCP-1 持続注入による実験関節炎の誘導とその制御

分担研究者：近藤 啓文

北里大学医学部 内科学 教授

研究要旨

慢性関節リウマチ(RA)の病因は未だ不明であるが、関節炎局所に浸潤したマクロファージが多彩な炎症性サイトカインを産生し、関節炎の病態形成に主要な役割を果たしていることが明らかとなって来ている。しかし、RAにおけるマクロファージ浸潤の機序には不明の点が多い。そこで、本研究はマクロファージ走化活性を示す代表的なケモカインである MCP-1 の関節炎における役割を解明するために、家兎膝関節内にリコンビナント家兎 MCP-1 5 μ g を2週間にわたって持続注入し、その効果を解析した。MCP-1 は関節局所へのマクロファージと好中球の浸潤のみならず、血管新生、滑膜細胞の重層化などの関節炎の病態を惹起した。MCP-1 による好中球の浸潤は、抗 IL-8 抗体の同時投与により抑制されたことから、MCP-1 による内因性 IL-8 の産生誘導を介していることが明らかとなった。これらの結果は関節炎の病態形成における MCP-1 の重要性を示すと共に、マクロファージ走化性ケモカインの制御による関節炎治療の可能性を示唆している。

A. 研究目的

慢性関節リウマチ(RA)の滑膜炎局所には、マクロファージ、T細胞、B細胞などによる多彩な細胞浸潤が認められる。これらの浸潤細胞はサイトカインやプロテアーゼ、活性酸素、自己抗体などの産生や、細胞間相互作用を通じて関節炎の病態形成に深く関与している。RAの病因は未だ不明であるが、近年のサイトカイン研究はRAの病態の多くにサイトカインが主要な役割を果たしていることを明らかにした。なかでも、滑膜炎局所のマクロファージは多くの炎症性サイトカインを産生、放出していることから関節炎の病態形成における主要な細胞と考えられている。マクロファージは炎症局所で産生された走化因子により炎症巣に浸潤・集積し、活性化される。したがって、RAにおけるマクロファージの浸潤と活性化の機序を解明することは、RA研究の重要な課題と言える。近年、ケモカインと総称される走化性サイトカインが多数見

出され、炎症におけるケモカインの意義が明らかにされてきている。私どもは、マクロファージ走化性ケモカインである MCP-1 の産生がRAの関節炎局所で亢進していることを見出し報告している。そこで、本研究では、MCP-1を家兎膝関節内に mini-osmotic pump を用いて持続的に注入することにより、関節炎におけるマクロファージ走化・活性化因子の意義を解明することを目的とした。

B. 研究方法

1) リコンビナント家兎 MCP-1 5 μ g に生理食塩水 200 μ l を加え、mini-osmotic pump(Alzet社)内に充填する。日本白色家兎の膝関節内側皮下を麻酔下にて切開し、mini-osmotic pump を膝関節内側に固定し、mini-osmotic pump にポリエチレンチューブを連結して関節腔内に留置した。かかる osmotic pump により MCP-1 を2週間にわたり、家兎膝関節腔内に注入した(～14.9ng/hour)。対照には、生理食塩水の

みを注入した。

2) 注入1週間、および2週間後に家兎を麻酔化にて屠殺し、関節腔内への浸潤細胞数と分画の測定、滑膜組織の病理学的検討をおこなった。

3) 滑膜組織における IL-8 の発現は、特異的なプライマーを用いた RT-PCR 法により増幅し、southern hybridization により解析した。

4) MCP-1 と同時に、抗 IL-8 中和抗体(WS-4)を関節腔内に1週間持続注入し、抗 IL-8 中和抗体の細胞浸潤に及ぼす作用を検討した。

5) リコンビナント家兎 MCP-1 は東京大学医学部衛生学 松島綱治教授より供与を受けた。

C. 研究結果

MCP-1 5 μ g を家兎膝関節腔内に持続注入した後に、関節腔内を生理食塩水で洗浄し浸潤細胞を回収した。浸潤細胞は持続注入1週間後で $3.2 \pm 1.8 \times 10^5$ /関節 (m \pm SD)、2週間後で $7.6 \pm 3.1 \times 10^4$ /関節であり、関節腔内への細胞浸潤は対照に比しいずれも有意に増加した。浸潤細胞の分画は、投与2週間後では95%以上がマクロファージであったのに対し、投与1週間後では約60%がマクロファージ、約40%が好中球であった。(図1)

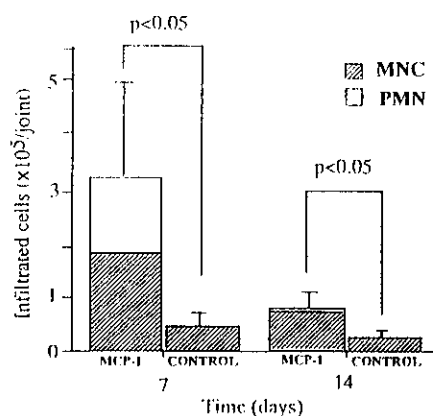


図1 MCP-1 関節内持続注入による関節内への細胞浸潤の誘導

リコンビナント家兎 MCP-1 5 μ g を2週間にわたって日本白色家兎膝関節腔内に持続注入し、関節腔内に浸潤した細胞数とその分画を解析した。

2) MCP-1 5 μ g の関節内持続注入は膝関節の腫脹や発赤を惹起しなかった。

3) MCP-1 の持続注入1週間後では、滑膜組織に軽度のマクロファージ浸潤が認められたが、好中球の浸潤はみられなかった。また、滑膜表層細胞には形態的变化は認められなかった。一方、持続注入2週間後では、滑膜組織への顕著なマクロファージの浸潤と、滑膜細胞の重層化、更には滑膜表層下に血管の増生が明らかに認められた。対照群では、滑膜細胞の重層化がわずかにみられたのみであった。これらの病理学所見は MCP-1 の持続注入が滑膜炎を惹起し得ることを示している。

4) MCP-1 の1週間関節内持続注入が好中球の浸潤を誘導することから、関節組織における好中球走化因子 IL-8 の発現を RT-PCR にて検討した。MCP-1 を1週間持続注入した家兎滑膜組織では、IL-8 遺伝子の発現が対照に比し有意に増加していた。

5) そこで、MCP-1 による好中球浸潤が内因性 IL-8 により、実際に誘導されているかどうかを抗 IL-8 抗体の同時投与により検討した。用いた抗 IL-8 抗体(WS-4)は家兎 IL-8 への中和活性を持つモノクローナル抗体である。MCP-1 5 μ g と抗 IL-8 抗体(WS-4) 500 μ g を mini-osmotic pump に充填し、1週間持続注入した。抗 IL-8 抗体は有意に MCP-1 による好中球浸潤を抑制した(図2)。

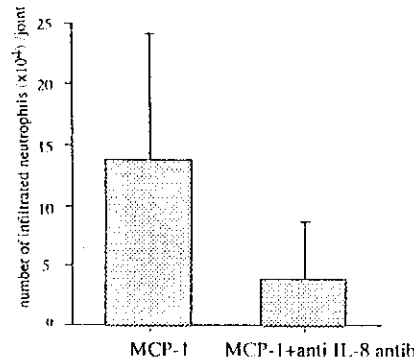


図2 MCP-1 関節内持続注入による好中球浸潤に対する抗 IL-8 中和抗体の効果

リコンビナント家兎 MCP-1 と抗 IL-8 中和抗体を1週間にわたり日本白色家兎膝関節腔内に持続注入し、抗 IL-8 中和抗体の好中球浸潤に及ぼす影響を解析した。

D. 考察

RA の関節炎局所においてケモカインの発現が亢進していることは、私どもを含め複数の研究者が既に報告している。しかし、ケモカインが関節炎の病態形成にどの程度関与しているのかについては不明の点が多い。私どもは、好中球走化性ケモカインである IL-8 の関節炎における役割を解析する為に、家兎の急性並びに慢性関節炎モデルを作成し、抗 IL-8 中和抗体を投与し、その効果を検討した。かかる研究から、IL-8 が急性関節炎のみならず慢性関節炎の誘発期における好中球浸潤を惹起する最も主要なケモカインであることを明らかにした。

RA の病態の大部分は、関節炎局所で産生されるサイトカインにより形成されると推測されている。また、RA の滑膜組織で産生されるサイトカインは、ほとんどがマクロファージ又は滑膜線維芽細胞由来であることが確認されている。そこで、本研究はマクロファージ走化性ケモカインである MCP-1 を家兎膝関節内に持続注入し、その効果を解析した。MCP-1 は関節内にマクロファージの浸潤を実際に惹起するだけでなく、結果的に IL-8 産生を介した好中球浸潤や、滑膜表層細胞の重層化、血管新生などの関節炎の諸病態を引き起こした。これらの結果は、マクロファージの浸潤と活性化を抑制することにより、関節炎の進展を制御し得る可能性を示唆している。したがって、MCP-1 だけでなく、マクロファージ走化活性をもつ CC ケモカインに対する中和抗体や、CC ケモカインの受容体に対するアンタゴニストは、RA のみならず多くの慢性炎症性疾患の治療にも応用され得る重要な治療戦略と考えられ、今後の開発が期待される。本研究は関節炎における MCP-1 の役割の一端を明らかにした。今後、MCP-1 の制御法の開発と関節炎への応用をめざしたい。

E. 結論

マクロファージ走化性ケモカインである MCP-1 の家兎膝関節内への持続注入は、マクロファージの浸潤を惹起すると共に、IL-8 の産生誘導を介した好中球の浸潤、滑膜表層細胞の重層化、更には血管新生などの関節炎の諸病態を惹起した。したがって、MCP-1 などのマクロファージ走化性ケモカインによるマクロファージの浸潤と活性化は、関節炎の病態形成の中心に位置するプロセスであると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Nishimura A., Akahoshi T., Takahashi M., Takagishi K., Itoman M., Kondo H., Takahashi Y., Yokoi K., Mukaida N., Matsushima K.: Attenuation of monosodium urate crystal-induced arthritis in rabbits by a neutralizing antibody against interleukin-8. *J. Leukoc. Biol.* 1997, 62 (444-449)

2. 学会発表

西村 明人、赤星 透、高岸 憲二、糸満 盛憲、近藤啓文
mcp-1 持続注入による家兎実験関節炎の誘導、第 42 回日本リウマチ学会総会・学術集会、1998

Nishimura A., Akahoshi T., Ohtaka F., Nasuno S Takagishi K., Kondo H., Itoman M.: Experimental arthritis induced by continuous infusion of MCP-1 in rabbit knee joint. 62nd National Scientific Meeting of American College of Rheumatology, 1998.

サイクリックAMPシグナル伝達系を利用したRAの新しい治療戦略

分担研究者：山田 秀裕

聖マリアンナ医科大学 内科学・臨床検査医学 助教授

研究要旨

我々は、慢性関節リウマチ(RA)の関節炎局所で産生される PGE が、パンヌス形成と関節破壊を制御する生体防御因子であるという仮説を立証してきた。さらに PGE の抗リウマチ作用は、滑膜組織の PGE 受容体活性化による細胞内 cAMP 上昇反応を介したものであり、ペントキシフィリンなどのホスホジエステラーゼ阻害薬により相乗的に増強されることを明らかにした。そこで、関節炎局所に集積する lipo-PGE1 (アルプロスタジル) とペントキシフィリン併用療法の RA に対する有用性を臨床的に検討した。活動性 RA 患者計 7 症例に対し、4 週間、アルプロスタジル 10 μ g/日を点滴静注し、ペントキシフィリン 300 μ g/日を経口投与した。7 例中 4 例で ACR20 %改善基準を満たした。4 週後の平均改善率は、腫脹関節数 48 %、疼痛関節数 23 %、ADL スコア 16 %であった。副作用はみられなかった。有効であった 4 例は、ペントキシフィリン内服を継続してアルプロスタジルの中止したところ、2 週以内に関節所見の再燃と CRP の再上昇がみられた。lipo-PGE1 とペントキシフィリン併用のような、滑膜炎組織における細胞内 cAMP シグナル伝達経路の増幅を図ることは、新しい RA の治療戦略として期待される。さらに、PGE 産生を特異的に抑制する COX 阻害薬は RA 滑膜炎と関節破壊を助長する可能性が考えられる。

A. 研究目的

慢性関節リウマチの特異的病態は、増殖性滑膜炎による肉芽腫様組織、いわゆるパンヌス形成と、それによる関節破壊である。したがって、パンヌス形成を抑制することが RA 治療の最重要課題である。当研究室では、ヒト滑膜細胞によるパンヌス形成を再現する *in vitro* および *in vivo* 病態モデルを確立した。このモデルにおけるパンヌス様組織形成と TNF- α 産生は、プロスタグランジン E(PGE)により用量依存的に抑制され、シクロキシゲナーゼ(COX)阻害薬で内因性 PGE 産生を抑制すると逆に増強されることを明らかにした。さらに、20 μ g/Kg の lipo-PGE1 (アルプロスタジル) の静脈内投与により、II型コラーゲンマウス関節炎のパンヌス形成と関節破壊が顕著に抑制

されることを明らかにした。これらの成績は、関節炎局所で産生される PGE は、パンヌス形成と関節破壊を抑制する生体防御因子であり、PGE の作用を増強することが RA の治療に結びつくことが示唆された。

一方、かかる PGE1 の抗リウマチ作用は細胞内 cyclic AMP 産生を介したものであり、cAMP 代謝阻害薬のペントキシフィリンにより約 100 倍増強されることを明らかにした。既に欧州では、ペントキシフィリン 1600 μ g/日の大量投与が難治性 RA に有効であることが報告されているが、消化器症状の副作用が問題となっている。したがって、PGE 製剤とペントキシフィリンの少量を併用することにより滑膜炎組織における細胞内 cAMP シグナル伝達の増幅を図ることは、RA の新しい治療戦略になると考

えられた。

そこで本年度は、RA に対するアルプロスタジルとペントキシフィリン併用療法の有用性を臨床的に検討することを目的とした。

B. 研究方法

米国リウマチ協会(ACR)の RA 診断基準を満たし、発症後 6 か月以上を経過している患者で、試験開始時に以下の 3 項目の条件を満たす患者を対象とした。(1)血沈値 31mmHg/h 以上、(2)疼痛関節数；6 個以上、(3)腫脹関節数；3 個以上。その他の選択基準や除外基準は、他の抗リウマチ薬の臨床試験と同様に設定した。投与方法は、アルプロスタジル 10 μ g を 100ml 生理食塩水に溶き連日点滴静注し、ペントキシフィリン 300mg/日を経口投与した。投与期間は 4 週間とした。評価は、ACR コアセットを用い、20%改善基準を満たしたものを有効と判定した。本臨床試験は、本学倫理委員会の承認の元、患者からインフォームドコンセントを得手行われた。

C. 研究結果

臨床試験は現在までに計 7 症例に行われた。平均年齢 58 歳、5 例はリウマトイド因子高値であった。7 例中 4 例で ACR20%改善基準を満たした。無効の 3 例中 2 例はリウマトイド因子陰性であった。4 週後の平均改善率は、腫脹関節数 48%、疼痛関節数 23%、ADL スコア 16%、CRP 8%であった。副作用はみられなかった。有効であった 4 例は、ペントキシフィリン内服を継続してアルプロスタジルを中止したところ、2 週以内に関節所見の再燃と CRP の再上昇がみられた。

D. 考察

PGE は、ブラジキニンの疼痛閾値を下げ

て関節痛の発現に関与し、血流量の増加や血管透過性の亢進による関節周囲の浮腫に関与することから、炎症のメディエーターと考えられてきた。さらに、PGE 産生を抑制する COX 阻害薬が多数開発され、症状の緩和を目的に第 1 選択薬として投与されている。しかし、PGE には種々の抗炎症、抗免疫作用が知られている。マクロファージからの TNF- α 等の炎症性サイトカイン産生抑制、T 細胞の Th-1 反応抑制、線維芽細胞からの MMP 産生抑制、好中球からの活性酸素産生抑制などが報告されている。in vivo においてもアジュバント関節炎、実験的間質性腎炎、成人呼吸窮迫症候群などの抑制効果が報告されている。

昨年までの研究で、滑膜細胞による TNF- α 産生やパックス様組織形成が、COX 阻害薬で増強され、PGE 添加により抑制されること、さらに、PGE1 の抑制作用が細胞内 cAMP を介することを明らかにした。また、アルプロスタジル 20 μ g/Kg の投与がマウス II 型コラーゲン関節炎におけるパックス形成や関節破壊を抑制することを証明した。以上の成績は、関節炎局所で産生される PGE が、滑膜炎やパックス形成を抑制する生体防御因子の一つであることを示している。さらに、滑膜細胞に発現する PGE 受容体は飽和されてはならず、薬理量の PGE1 投与が関節炎を抑制しうることを示唆する。

PGE1 を臨床に応用する際に投与量が問題となった。II 型コラーゲンマウスの実験では、lipo-PGE1 単独投与では、臨床で用いられる量の約 50 倍を必要とした。したがって、投与量を減量して、PGE1 の作用を増強する戦術が必要となった。ペントキシフィリンは、ホスフォジエステラーゼ阻害作用により細胞内 cAMP の半減期を延長する作用があり、PGE と同様の抗炎症、抗免疫作用を発揮することが知られている。

欧州では、ペントキシフィリン 1200-1600mg の経口投与により難知性 RA の 50 % が改善した。しかし、かかる投与量では消化器症状などの副作用のため臨床応用には至らなかった。そこで、*in vitro* 滑膜炎モデルを用いて検討した結果、PGE1 の抗リウマチ作用は、ペントキシフィリンの併用により約 100 倍に増強されることが明らかとなった。

本研究は、臨床的に安全性が確立されている少量のアルプロスタジルとペントキシフィリンの併用により RA 関節炎を抑制しうることを明らかにした。その効果発現は治療開始 2 週間で明らかとなり、lipo-PGE1 中止後 2 週間以内に関節炎が再燃したことから、従来の抗リウマチ薬より速効性である点が特徴的である。これは、cAMP シグナル伝達を介する TNF- α 発現抑制によるものと考えられる。さらに、関節炎局所で産生される PGE が、滑膜炎を制御する生体防御因子の一つであるという仮説が証明された。

以上の成績は、RA の早期から非ステロイド抗炎症薬(COX 阻害薬)を常用する従来の治療体系に疑問を投げかけるものである。過去の COX 阻害薬を用いた二重盲検比較対照試験の成績を調べると、朝のこわばり、疼痛の指標、患者の印象では効果が腫脹されているが、ACR の改善基準の必須項目である腫脹関節数と疼痛関節数の両者を 20 % 以上改善した成績はなく、血沈や CRP は全く改善していない。さらに本研究からは、COX 阻害薬はパヌス形成や TNF- α 産生をむしろ増強した。したがって、RA 患者に COX 阻害薬である非ステロイド抗炎症薬を連用することは、滑膜炎の遷延化や関節破壊を助長する危険性が示唆される。関節破壊を早期に抑制することが重要な早期 RA 患者の治療においては、むしろ非ステロイド抗炎症薬の使用を控える

べきと考えられる。最近、COX-2 選択的阻害薬が開発され、消化性潰瘍の副作用が少ないことから、既に米国ではその使用が爆発的に増加しつつある。今後わが国においても導入されるであろう。しかし、COX 阻害薬が RA 関節炎の治療機転を阻害する可能性が強く疑われる以上、その導入や使用には、慎重に対応すべきと考える。

E. 結論

RA 関節炎局所で産生される PGE は、滑膜炎を制御する生体防御因子の一つである。PGE1 製剤とペントキシフィリン併用のような、滑膜炎組織における細胞内 cAMP シグナル伝達経路の増幅を図ることは、新しい RA の治療戦略として期待される。さらに、非ステロイド抗炎症薬を常用する従来の RA 治療体系は、見直しが必要と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) E Moriuchi, H Yamada, M Yamasaki, C Kase, O Ishii, N Ohya, Y Ichikawa. Synergistic inhibition of pannus tissue development *in vitro* by PGE1 plus phosphodiesterase 4 inhibitors. *Arthritis Rheum.* 41:S101,1998

2) Ishii O, M Yamasaki, C Tanaka, E Moriuchi, C Kase, N Ohya, T Matsuda, Y Ichikawa, H Yamada. Lipo-PGE1 plus pentoxifylline for the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 41:S60,1998.

RAの予後予測因子としての血清MMP-3の有用性 -Prospective studyにおける検討-

分担研究者 山中 寿

東京女子医科大学 附属膠原病リウマチ痛風センター 助教授

【研究要旨】早期RA例の骨破壊の進展には個体差が存在するが、早期RAの治療ガイドライン確立のためには予後を予測する指標が必要である。我々は、prospectiveに登録した早期RA患者の血清matrix metalloproteinase-3 (MMP-3)を経時的に測定し、早期RAの予後予測因子としての有用性を検討した。血清MMP-3は経過の長いRAのみならず、早期RAでも健常者より明かに高値であった。また早期RA例の血清MMP-3は、その後6~12か月間の骨破壊の進行（Larsen スコアにて評価）と相関し、血清MMP-3が治療経過中に上昇または高値を維持した症例では関節破壊が進行性したが、血清MMP-3が治療経過中に低下した症例では非進行性であった。したがって、血清MMP-3は早期RAの予後予測因子として臨床的に有用と考えられた。

A. 研究目的

早期RAにおける骨破壊の進展にはかなりの個体差が存在し、治療方針を決定する時の問題となっている。早期RAの治療ガイドライン確立のためには予後を予測する指標を確立することが重要である。我々は、prospectiveに登録した早期RA患者の血清matrix metalloproteinase-3 (MMP-3)を測定し、早期RAの進行を予測する因子としての有用性を検討した。

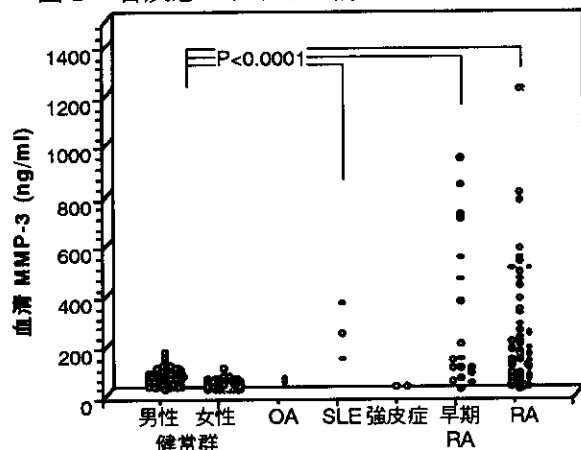
B. 方法

健常者267例（男性94名、女性173名）、各種リウマチ性疾患患者62例（RA 55例、変形性関節炎2例、SLE 3例、強皮症2例）の血清、当センターで1991年から継続中のprospective studyで登録した早期RA（発症後1年以内）のうち19例の経時的保存血清を対象とし、MMP-3をサンドイッチEIA法で測定した。

C. 結果

血清MMP-3 (ng/ml) は、健常者 42.2 ± 27.2 、OA (n=2) 49.0 ± 12.7 、SSc(n=3) 28.0 ± 5.6 に比してRA群(平均罹病12年, n=55) 224.5 ± 237.3 、早期RA群 (n=19) 295.2 ± 304.4 と高値であった。検討した限りでは変形性関節炎、強皮症では健常人と同様に低値であったが、既に報告されているようにSLE例では軽度の上昇が認められた（図1）。早期RA患者のみの検討で、血清MMP-3は発症年齢、発病後の期間とは相関しなかった。また、血清MMP-3は、同一検体で測定したリウ

図1：各疾患における血清MMP-3の分布



マトイド因子の力価との有意な相関は認めなかった。血清MMP-3と炎症の指標の関連を検討すると、CRP (R=0.393)、赤沈 (R=0.356) と弱い相関を認めた（図2）。

図2：血清MMP-3と炎症の指標

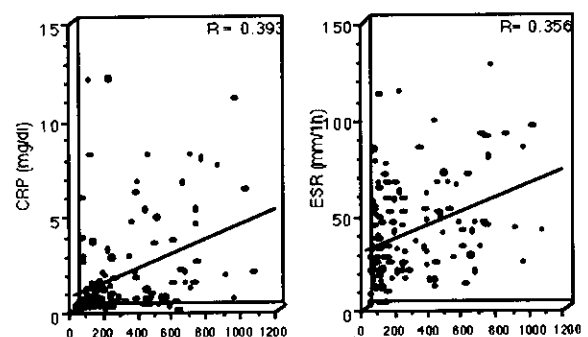


表 1 : 骨破壊の進行度とMMP-3,CRP,ESRの関連

A : 検査後6か月間における骨破壊

| ΔLarsenスコア | n | Larsenスコア | MMP-3 (ng/ml) | ESR (mm/1h) | CRP (mg/dl) |
|------------|----|-------------|-----------------|-------------|--------------|
| >10 | 8 | 9.3 ± 13.8 | 415.5 ± 305.4 | 59.5 ± 23.0 | 4.5 ± 3.5 |
| 5~9 | 14 | 10.5 ± 9.6 | 354.1 ± 365.7 | 47.2 ± 25.5 | 2.1 ± 3.0 |
| 1~4 | 14 | 6.1 ± 3.7 | 163.6 ± 235.3 * | 43.3 ± 25.5 | 1.0 ± 1.1 ** |
| <0 | 7 | 17.1 ± 17.3 | 151.7 ± 114.4 * | 37.5 ± 25.8 | 1.4 ± 2.2 |

B : 検査後12か月間における骨破壊

| ΔLarsenスコア | n | Larsenスコア | MMP-3 (ng/ml) | ESR (mm/1h) | CRP (mg/dl) |
|------------|----|-------------|------------------|-------------|-------------|
| >10 | 20 | 9.2 ± 9.6 | 362.2 ± 305.6 | 52.8 ± 22.8 | 2.7 ± 2.7 |
| 5~9 | 16 | 7.4 ± 6.8 | 240.1 ± 246.7 | 39.0 ± 25.3 | 2.1 ± 3.2 |
| 1~4 | 7 | 4.9 ± 3.3 | 70.9 ± 31.6 **** | 45.5 ± 26.6 | 0.8 ± 0.9 * |
| <0 | 8 | 16.1 ± 10.6 | 120.6 ± 79.1 *** | 34.2 ± 23.5 | 0.8 ± 1.0 * |

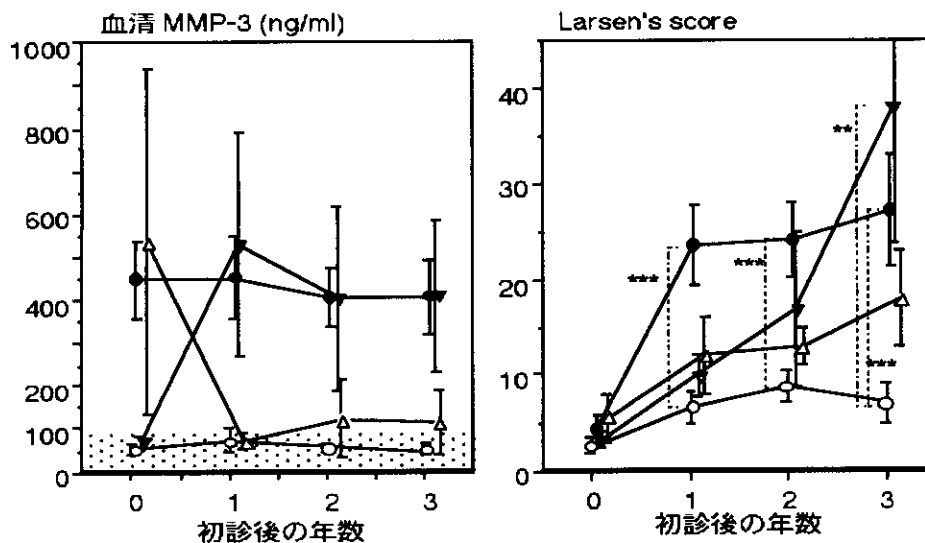
初診後1年以内の受診で、受診時のLarsenスコアが50未満の例を対象として解析した。

*、**、***、****はΔLarsenスコア>10群との有意差を示す。

次に、早期RAの骨破壊をLarsen's scoreで評価し、進行度をLarsen's scoreの増加度で層別化して、骨変化の進行に及ぼす因子の検討を行った。その結果、血清MMP-3は検査後6か月間、12か月間の骨破壊進行と相関を示した。CRPや赤沈に関しても同様の検討を行ったが、血清MMP-3が最も骨破壊の進行と関連する因子であることが示された(表1)。

さらに、初診後3年間の経過観察中、血清MMP-3が持続的に低値であった5例(-○-)、持続的に高値であった9例(-●-)、低値から高値になった3例(-▼-)、高値から低値になった2例(-△-)の骨変化の動きを検討した(図3)。その結果、早期RA例の関節破壊は血清MMP-3が治療経過中に上昇または高値を維持した症例は進行性で、低下した症例は非進行性であることが示された。

図3 : 血清MMP-3の推移と骨破壊の進展



以上の結果から、血清MMP-3は早期RAの関節破壊を予測する因子として臨床的に有用であることが示された。

D. 考察

我々は1991年から早期RAに対するprospective studyを継続しており、その解析から、背景因子としては、女性、発症時年齢が若い、初診時にACR1987年基準を満たす、リウマトイド因子陽性、特にIgGまたはIgAリウマトイド因子陽性、発症後抗リウマチ薬投与開始までの時間が長いこと、早期に骨びらんが出現することなどが、また、治療経過からは、炎症所見（特に血清CRP）が骨破壊の予後予測因子であることを厚生省研究班において報告してきた。特に、初診時に炎症が強い症例でも早期から炎症を抑制することが関節破壊の進行を遅延させる効果があることがCRPを指標とした解析により明かにした。このように炎症の指標は早期RAの予後を予測する因子であるが、あくまで非特異的な指標であって、関節炎以外の病態が並存する場合は適切な指標であるとはいえない。したがって、より特異的な指標の確立が望まれていた。

このような背景から、より特異的な臨床指標として今回、血清MMP-3を検討した。その結果、血清MMP-3は進行したRA例のみならず早期RAでも高値である症例が多く、高値が持続する症例は関節破壊が進行する傾向が認められた。また、血清MMP-3は採血時から6～12か月後のLarsenスコアと有意に相関し、骨破壊の進行を予測する指標であることが明かになった。CRPでも初診後1年までは同様の傾向は認められたが、初診後2年以降では相関は消失したのに対し、MMP-3はより有意の相関で、初診後2年以上を経過しても高い相関が認められた。

MMP-3は軟骨基質を分解するマトリックスメタロプロテアーゼの一つで、RAの関節破壊の一因であると推定されている。MMP-3は軟骨細胞以外に、滑膜細胞、血管内皮細胞からも産生されることが明かにされている。今回の検討で示された早期のRAにおける血清MMP-3は、早期RAの病態である滑膜表層細胞の増生や著明な血管内皮細胞を反映したものであり、軟骨の破壊とは異なるとも考えられる。

今回の検討から、早期RAにおいて関節破壊を最小限に抑えるためには、血清CRPや臨床症状のみならず血清MMP-3も指標として用いて血清MMP-3が高値であれば早期から抗リウマチ薬を投与するべきであると考えられる。また、抗リウマチ薬の投与にも関わらず血清MMP-3が持続的に高値の症例に対しては、積極的に抗リウマチ薬の併用や変更を考慮することが必要であると考えられる。このような血清MMP-3を指標に用いた新たなprospective studyの構築が必要であると考えられた。

E. 結論

血清MMP-3は早期RAの予後を予測する指標として臨床的に有用と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 柏崎禎夫、山中 寿、松田祐子：慢性関節リウマチの今日の治療戦略 リウマチ 36：791-802、1996
- 2) 柏崎禎夫、山中 寿、松田祐子：慢性関節リウマチの早期診断・早期治療の必要性和その実際 最新内科学体系 プロGRESS 4：330-344、1997 中山書店
- 3) Yuko Matsuda, Hisashi Yamanaka, Kenshi Higami, Sadao Kashiwazaki: Time lag between active joint inflammation and radiological progression in patients with early rheumatoid arthritis. J Rheumatol 24:427-32, 1998
- 4) H. Yamanaka, et al: Serum metalloproteinase -3 as a predictor of joint destruction during the next six months in patients with early rheumatoid arthritis. (in preparation)

2. 学会発表

- 1) 山中 寿、松田祐子、仙道和子 他：早期RAの骨破壊を予測する指標としての血清MMP-3の有用性 第43回日本リウマチ学会総会発表予定（1999年6月、札幌）

慢性関節リウマチ早期治療指針の EBM 導入に関する研究

分担研究者 吉田 勝美 聖マリアンナ医科大学教授

研究要旨

慢性関節リウマチは、QOL や社会活動性の低下を招き、大きな疾病負担を有している。本研究は、global standard として使われている bucillamine と methotrexate のそれぞれ単剤投与、併用療法の有効性を明らかにすることを目的にしている。一方、evidence-based medicine (EBM) の認識が高まり、臨床研究として EBM の情報源となるように計画することが要求されている。今回は、科学的根拠に足る研究収集機関としての Cochrane collaboration の機能に準じて、臨床研究のあり方を検討した。臨床試験の信頼性を高めるためには、研究のデザインや対象者数を確保することにより、内部妥当性を高める必要がある。本研究では、無作為化の管理手法、endpoint の客観的測定、多重検定を避けるための解析計画書の作成といった観点から研究精度向上に努めた。

A. 研究目的

慢性関節リウマチは、QOL や社会活動性の低下を招き、大きな疾病負担を有しており¹、近年、早期からの組合せ療法に関心を呼んでいる²。

慢性関節リウマチ早期治療指針研究班で実施される無作為化比較対照試験の臨床成績を解析し、早期治療法の有効性を比較することである。とくに、evidence-based medicine (以下、EBM と略) に適切な情報を提供する成果を提供することを主目的として、臨床疫学的に課題を検討した。

B. 方法

EBM の要素として、問題の定式化、文献の収集、文献の批判的吟味、情報の伝搬播種の段階が考えられる。問題の定式化として、慢性関節リウマチの disease burden を検討した。また、今回の endpoint 指標を検討した。慢性関節リウマチの経過において、EBM に耐える研究成果を得るために必要とされる症例数を検討した。

慢性関節リウマチ早期治療に関する先行研究

をレビューして、調査方法、検討薬剤、観察期間、対象数、主たるアウトカムについてまとめた。

C. 結果

臨床試験のデザインは、2年間の投与期間で多施設無作為化比較対照試験であり、1群は methotrexate、2群は bucillamine、3群は methotrexate と bucillamine の2者併用療法である。慢性関節リウマチの疾病負担は、関節の疼痛や変形が強く日常生活の QOL や社会活動が制限される点である。また、その有病数は約40万人とされ、早期治療指針の開発は臨床上有用な意義を有するものであった。

Endpoint として、ACR 疾患活動性評価のためのコアセットで50%以上の疾患活動性の改善が2年間維持でき、かつ副作用が出現しない、手足のレントゲン写真による関節の進展度を用いる。ACR 疾患活動性評価は、疼痛関節数および腫脹関節数が一定数以上減少し、かつ患者による疼痛評価、患者による疾患活動性の全般的評価、医師による疾患活動性の全般的評価、患者による身体機能の評価、九世紀反応物質の5

項目中3項目以上で定率以上の改善を認めたとのとしている。

サンプルサイズの決定について

Cohen(1977)の方法を用いて、率の差を基準として

検出力80%、90%として有意水準を5%とした場合の必要とされる各群のデータ数を算出した。

表には、横軸に2群間で期待される率の差を示した。縦方向に検出力が80%、90%として、必要データ数を計算したものを示す。

| 検出力 | 率の差 5% | 率の差 10% | 率の差 20% | 率の差 30% |
|-----|-----------|------------|------------|------------|
| 80% | 1238 | 306 | 73 | 30 |
| 90% | 1714 | 423 | 101 | 41 |

解析に必要とされる症例数は、各治療群間での有効率の差を20%とし、検出力80%、有意水準5%とした場合に必要とされる症例数を算出したところ、73例であり、脱落例を考慮して、初期必要例を100例として計画した。表のように解析計画書をあらかじめ作成した。

D. 考察

EBMの中心的活動として、Cochrane collaborationの存在があり、systematic reviews、abstracts of reviews、controlled trial register、methodology reviewの4つのデータベースを構築している。本調査がEBMとして情報を提供

するには、controlled trialに登録可能な臨床試験を構成することが必要である。そのためには、臨床疫学的に内部妥当性と外部妥当性を検討しておく必要がある。内部妥当性にはバイアス、偶然、攪乱因子による影響を調整することであり、コントローラーや電話法による無作為管理の徹底、ACR疾患活動性評価やSharp変法による関節所見の読影によるバイアスの除去、ベースライン調査による背景因子の確認を行うことが計画されている。

今回の投与計画で、率の差を20%程度と考え、脱落率を考慮すると100例ずつというデザインは妥当なものと考えられる。

治療効果に対する評価尺度として、精神面でのpsychological well being³や総合的な健康感⁴を使用したものがあり、疾病負担の改善を考える上で、最適な指標を何にするか議論になるものとする。

また、多重比較による検定の過誤を避けるために、primary endpointを2種類に制限している。また、解析計画書を作成することにより、探索的検定を行わないように配慮した。

E. 結論

EBMに適合した根拠を提供する臨床研究をデザインし、解析することを目的として、本年度の検討を行った。慢性関節リウマチ治療指針は、その疾病負担の観点から早期治療指針を確立することが可能である。

| 研究者 | 調査方法 | 検討薬剤 | 観察期間 | 人数 | 主たる結果 |
|---|------|---|------|--------|--------------------------|
| Verhoeven AC, et al.(1998) ⁵ | RCT | 1.Stepdown prednisolone methotrexate and sulphasalzine 2.sulphasalzine | 56週 | 76, 78 | 組合せ療法が直接費用でも優れている |
| Menninger H, et al.(1998) ⁶ | RCT | 1.methotrexate 2.gold sodium thiomalate | 36月 | 172 | Methotrexateが耐用でき、安全であった |

| | | | | | |
|--|-------------|-----------------------------------|------|-----|--|
| | | | | | た |
| Van den Borne BE, et al. (1998) ⁷ | RCT | 1. cyclosporine 2. chloroquine | 88 週 | 88 | 低量で cyclosporine が、ACR 改善で優れている。 同様に、腎毒性が chloroquine で多い |
| Munro R, et al. (1998) ⁸ | Prospective | Aurothiomolate | 5 年 | 440 | Intramuscular gold treatment が健康質問票に優れている |
| Eberhardt K, et al. (1996) ⁹ | RCT | 1. D-penicillamine 2. Placebo | 2 年間 | 180 | DPA が関節柔軟性に有効である。 |

- ¹ Verhoven AC, Boers M, Tugwell P. Combination therapy in rheumatoid arthritis: updated systematic review. Br J Rheum 1998;37:12-19
- ² Verhoeven AC, Boers M, Tugwell P. Combination therapy in rheumatoid arthritis: updated systematic review. Br J Rheum 1998;37:612-619
- ³ Listing J, Alten R, Brauer D, et al. Importance of psychological well being and disease activity in termination of an initial DMARD therapy 1997;24:2097- 2105
- ⁴ houssien DA, McKenna SP, Scott DL. The Nottingham health profile as a measure of disease activity and outcome in rheumatoid arthritis. Br J Rheum 1997;36:69-73
- ⁵ Verhoeven AC, Bibo JC, Boers M, et al. Cost-effectiveness and cost-utility of combination therapy in early rheumatoid arthritis: randomized comparison of combined step-down prednisolone, methotrexate and sulphasalazine with sulphasalazine alone. COBRA trial group. Br J Rheum. 1998;37:1102-1109
- ⁶ Menninger H, Herborn G, Sander O, Blechschmidt J, Rau R. A 36 month comparative trial of methotrexate and gold sodium thiomalate in rheumatoid arthritis. Br J Rheum 1998;37:1060-1068
- ⁷ van den Borne BE, Landewe RB, Goei The HS, et al. Combination therapy in recent onset rheumatoid arthritis: a randomized double trial of the addition of low dose cyclosporine to patients treated with low dose chloroquine. J Rheum 1998;25:1493-1498
- ⁸ Munro R, Hampson R, McEntegart A, et al. Improved functional outcome in patients with early rheumatoid arthritis treated with intramuscular gold: results of a five year prospective study. Ann Rheum Dis. 1998;57:88-93
- ⁹ Eberhardt K, Rydgren L, Fex E, Svensson B, Wollheim FA. D-penicillamine in early rheumatoid arthritis: experience from 2-year double blind placebo controlled study Clin Exp Rheum 1996;14:625-631

厚生省慢性関節リウマチ早期治療指針研究班

共同臨床試験

—DMARD早期併用療法の検討—

臨床試験実施計画書

試験計画の概要

I. この協同臨床試験の必要性

現在、我が国には約40万人の慢性関節リウマチ(RA)患者が存在し、関節の疼痛、変形のため、QOLが低下し、社会での活動が制限されている。また、患者の疼痛も甚だしく、さらに、多くの治療費を要するの事実である。

しかし、現在用いる抗リウマチ薬では関節破壊を完全に防止することはできず、患者の苦痛、QOLの改善を果たすこともできない。そこで、抗リウマチ薬の併用による強力な抗リウマチ作用が新しい治療法として期待される。一方、このような強力な治療を必要とする症例を早期に鑑別することも必要である。

本試験は、早期RA患者を対象に2種類の抗リウマチ作用を有する薬剤による併用療法の関節破壊、関節炎沈静に対する有効性と副作用を明らかにするとともに、関節破壊の速やかな症例を早期に特定する指標を見いだすために計画した。

II. 目的

慢性関節リウマチの治療の第一の目的は、関節破壊の阻止である。そのためには、1)より強力な治療薬の開発、2)抗リウマチ薬による早期治療法の確立、および3)併用療法の確立、が当面の課題である。

今回の研究では、早期RA患者を対象として、我国で利用可能な抗リウマチ作用を有する薬剤の2者併用療法の長期有用性を多施設共同で二重盲検無作為割り付けによる比較対照試験によって明らかにすることを主目的とする。さらに、強力な治療にもかかわらず関節破壊の進行する症例の予測因子も探求する。

なお、本臨床試験はヘルシンキ宣言の理念に則って計画する。

III. 臨床試験のデザイン

多施設二重盲検群間比較試験

IV. 調査対象薬剤

Methotrexate(メトトレキサート; MTX)単独, bucillamine(リマチル: BUC)単独, と methotrexateとbucillamineの2者併用療法