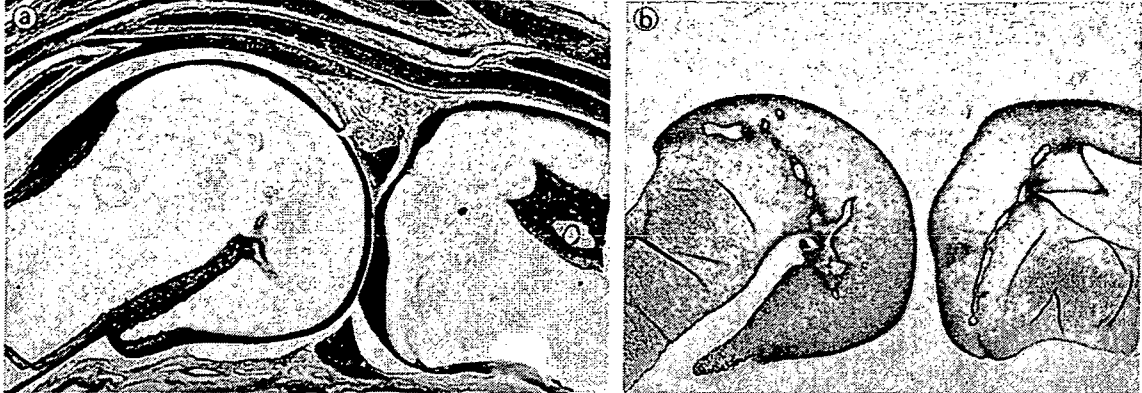


図2 ニワトリ胚の膝関節でのⅠ型とⅡ型コラーゲンの分布



15日目(stage 41)で関節の原型がほぼ完成している。

aはⅠ型, bがⅡ型コラーゲン蛋白(茶褐色)の分布である。Ⅰ型コラーゲンが主な成分を占めるのは関節包, 半月板, 滑膜, 靭帯, 軟骨表面の線維軟骨, 骨膜であり, Ⅱ型コラーゲンは関節軟骨や骨端軟骨に認められる。

図3 正常の関節構造のシエマ

膝関節の構成成分を図に示す。

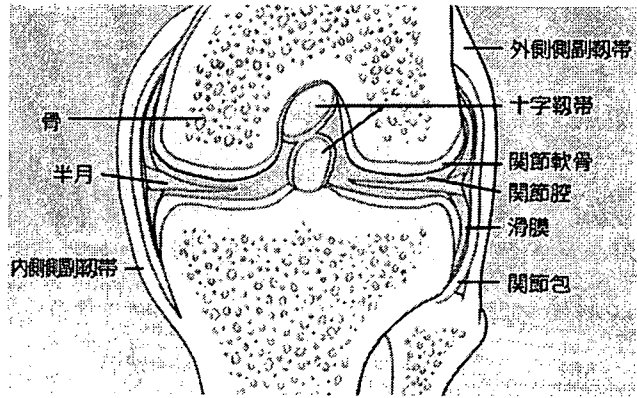
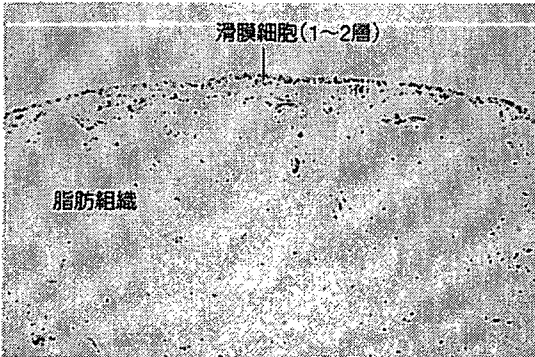


図4 病変のない滑膜組織



表層に1~2層の滑膜細胞を有し, その深部は血管網の発達した脂肪組織となっている。

#### ● 滑膜組織

滑膜組織は図4のごとく表層に1~2層の滑膜細胞を有し, その下は血管網の発達した脂肪組織となっている。表層の滑膜細胞は基底膜をもたない

ため関節腔側に向かって浮いているようにみえるが, 免疫組織化学で観察すると, ここにはフィブロネクチン, ヒアルロン酸, ラミニン, コラーゲンなどがみられ, 網のような状態で滑膜細胞を固定している。

滑膜細胞は炎症などの刺激のない場合はあまり特徴のない像をしており, 少数の粗面小胞体を持ち, 線維芽細胞様であるものの, 一方でマクロファージのように短い突起をわずかに有する細胞である。これらの細胞は腹膜や胸膜にみられるような中皮細胞と同じような形態であり, コラーゲン, ヒアルロン酸, ラミニンなど自分の足場となる物質を産生している。

表層下の組織は脂肪組織からなっており, 少量の血管網を伴う。血管は関節包のほうから入り, 滑膜の表層直下で毛細血管による血管網を形成す

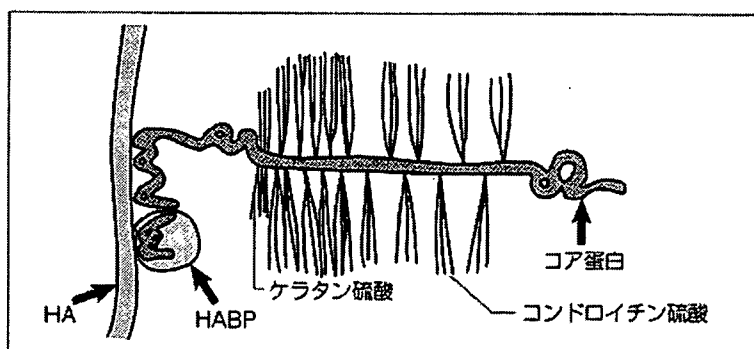
るが、RAの場合はこの血管を介する好中球浸潤が目立ち、関節腔に向かって遊走するようになる。

### ● 軟骨組織

軟骨組織は長幹骨の骨端部にみられ、一般には休止層、増殖層、肥大層などに分けられ、成熟した軟骨層を形成する。軟骨を構成する成分はⅡ型コラーゲンをはじめとする各種コラーゲン(I, II, V, VI, IX, X, XI, XIV型など)、プロテオグリカンなどであるが、最も多くを占めるのは水分で全体の75%にも達する。なお、軟骨の主要なプロテオグリカンはアグリカンとよばれ、ヒアルロン酸に結合し、巨大分子を形成する(図5)。アグリカンのコア蛋白にはコンドロイチン硫酸、ケラタン硫酸などのグリコサミノグリカンが結合しているが、それぞれがRAの炎症とともに血中に流入し、関節破壊のマーカになっている<sup>3)</sup>。なお、最近シトルリン蛋白の変異蛋白[抗環状シトルリン化ペプチド(cyclic citrullinated peptide; CCP)抗体]<sup>\*1</sup>もRAのマーカとして利用されるようになってきた<sup>4)</sup>。

図5 軟骨組織中のプロテオグリカンの構造

軟骨の主要なプロテオグリカンはアグリカンとよばれ、ヒアルロン酸(HA)に結合し、巨大分子を形成する。アグリカンのコア蛋白にはコンドロイチン硫酸やケラタン硫酸などのグリコサミノグリカンが結合している。



### ● 滑膜と軟骨、骨の移行部

この部分は柔らかい疎性結合組織と有窓性の血管からなる。滑膜と軟骨、骨の間にはっきりとした境界はなく、自然な形で移行する。このような構造上の特徴のために浮腫性変化が起こりやすく、血管の透過性も亢進しやすいため、さまざまな物質の沈着やマクロファージなどの浸潤も起こりやすい。

ヒトの関節の場合にはこの部分はbare areaやポケットとよばれており、RAの初期病変はここからはじまるといわれているが、あまり確かな証拠はなく、今後画像による解析が期待される。MRI/Mマウスなどの関節炎モデルで観察すると、初期の病変は骨膜から滑膜への移行部の、血管が入り込むperiphysis<sup>\*2</sup>からはじまる(図6)<sup>5)</sup>。

### ● 半月板

半月板は膝では大腿骨と脛骨との間にあってクッションのような役割をなし、それぞれの軟骨同士の間に入るような形になるため、軟骨の保護的役割や安定化をもたらす。半月板に損傷を受けると、ときとして関節の不安定性をもたらし、上下の軟骨をかえって傷つけるため除去される場合もある。

## ● 用語アラカルト

### \*1 抗cyclic citrullinated peptide (CCP)抗体

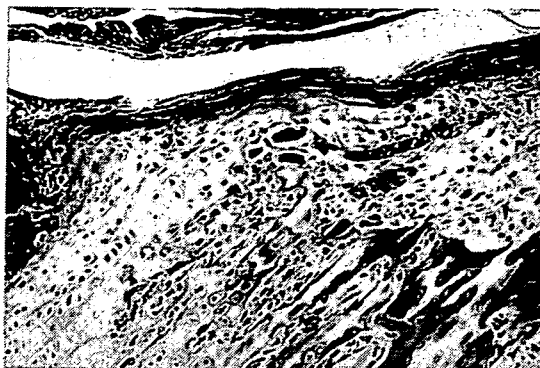
CCPが高感度にRA患者血清と反応することから、抗CCP抗体測定ELISAキットが開発された。特異度は89~98%と高く、感度も80%前後である。抗CCP抗体は、MRIでの骨髄浮腫の所見とともに、RAの早期診断に有用なマーカとして注目されている。血中よりも関節液中での値がより高値であることから、関節局所での抗体産生が考えられている。

### \*2 periphysis

成長軟骨、骨髄、骨膜に囲まれた部位で、骨芽細胞様細胞、軟骨細胞様細胞、線維芽細胞様細胞などの未分化間葉系細胞とともに血管も豊富である。解剖学的にはヒトRAの発症部位といわれるbare areaの近傍であり、この部位の炎症像はRAのパンヌスに類似している。

図6 MRL/マウスの関節炎早期にみられる変化

10週齢のMRL/マウスの大腿骨における、成長軟骨、骨髄、骨幹部骨膜の3点に囲まれた部分(periphysis)の像である。血管の増生やマクロファージの集簇が認められる。



(文献5より)

半月板は発生の項でも述べたが、I型コラーゲンが主体をなす線維軟骨からなり、プロテオグリカンを含むため弾力性を有する。この半月板の附着部は滑膜組織に移行しているため、RAでは炎症が容易に半月板まで波及し、場合によっては萎縮、吸収される。

#### ● 靭帯

靭帯はI型コラーゲンからなる線維性の束であり、膝関節では前十字靭帯、後十字靭帯、側副靭帯などからなるが、附着部はそのまま骨膜や軟骨組織などに移行している。この軟骨組織や骨膜への移行部は前述の滑膜と軟骨、骨の移行部に類似した構造を示すため、この付近での滑膜組織の炎症は容易に靭帯附着部を経由して骨組織に波及する。geodeとよばれる骨嚢胞は靭帯の附着部に頻発するが、これはこのような解剖学的に弱い部分に力が加わるからではないかと思われる<sup>9)</sup>。

#### ● 関節包

関節包は解剖学的には関節とその周囲組織とを分ける境界の組織である。関節内腔からみると、滑膜の脂肪組織から関節包の線維組織に移行している。靭帯や半月板と同様にI型コラーゲンが主体で、名前の示すとおり関節を包むようにある程度の厚さをもって周囲組織に移行する。RAでは炎症が高度な場合には関節包まで炎症が及び、その後の癒着化によって関節の変形が一層高度となり、亜脱臼、脱臼、強直などの原因にもなる。

### 関節疾患にみられる病理学的特徴

RAは自己免疫を背景とした全身性の慢性炎症性疾患であるが、「関節にはじまり関節に終わる」と表現されるように、関節が炎症の主たる標的となり、関節の変形や破壊に至る。わが国における患者の数は60~80万人といわれており、男女比は1:4ぐらいで女性が圧倒的に多い。なお、RAで血管炎あるいは関節外病変の高度な一群を、わが国では悪性関節リウマチ(malignant rheumatoid arthritis; MRA)とよんでいる。

RAでみられるX線上の特徴は、①関節裂隙の狭小化、②骨びらん、③骨粗鬆症、であり、MRIではそれに加えて、①滑膜・関節包炎、②骨髄浮腫、③軟骨びらん、などの所見も観察可能となっているが、このような時期にみられる病理組織学的な所見について以下に述べる。

### ※ RAIにみられる変化とその推移

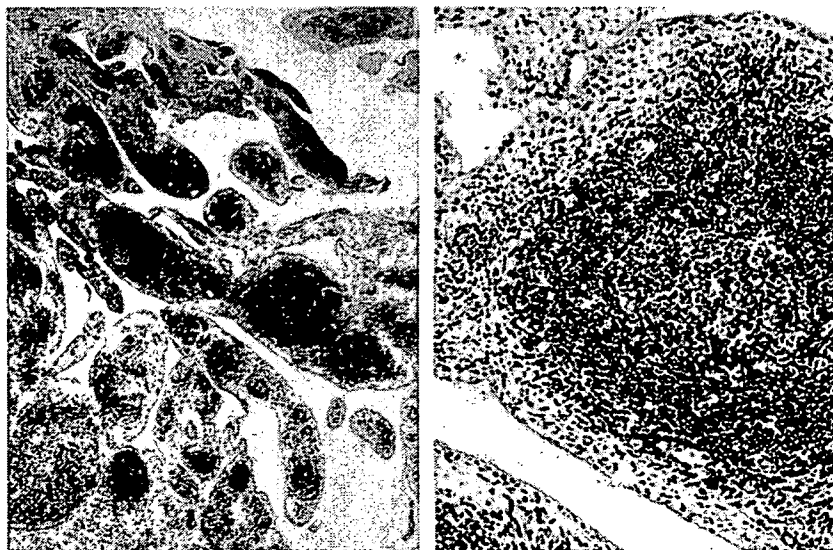
#### ● 初期像

ヒトRAの発症初期の患者から治療に直結しない検体を採取し、病理学的に観察することは社会的、人道的な面から困難となり、動物モデルや今後の画像技術の発展を待つしかない。CTやMRIによる診断が普及する以前には診断確定のために採取された試料で初期病変の解析を行うことがあった<sup>7)</sup>。対象はアメリカリウマチ学会(ACR)の1987年のRA診断基準7項目中4項目以上を満たす症例で、しかも追跡した結果、典型的なRAになった

症例である。主に発症1年未満の症例を検討したが、最も早期の症例は発症後1カ月であり、そこに認められたのは滑膜表層細胞のわずかな多層化と少数のHLA-DR陽性の紡錐形細胞の浸潤であった。また、深部で丈の高い内皮細胞をもつ血管 (high endothelial venule ; HEV) の周囲にもHLA-DR陽性細胞が認められる。このHEVはHLA-DRのような抗原提示やICAM-1のような接着分子を発現し、周囲にはリガンドとなるLFA-1陽性のリンパ球が集簇するようになる<sup>9)</sup>。この時期には血管周囲にCD3+のTリンパ球がわずかにみられるものの、Bリンパ球は認められない。発症5~6カ月ぐらいでTリンパ球の増加とともにBリンパ球が出現し、集簇した形で認められるようになる。その後、Tリンパ球はびまん性(CD8+)あるいは集簇(CD4+)した形でみられるようになり、症例によっては、CD20+のBリンパ球と共存するようになる。RAで典型的とされる胚中心をもつ構造に至るもの(図7)は全体の1~3割程度で、炎症が激しいものほど胚中心をもつようになるというわけでもなく、その成立に関しては不明である。また、細胞の集簇が高度になってリンパ濾胞を形成する時期に至るとともに血管の数は減少するが、残存する内皮細胞の丈は初期よりも高く、活性を示す血管が残るようになる。

図7 典型的なRAの滑膜組織像

滑膜には絨毛状増生がみられ、高度なリンパ球浸潤を示す。胚中心をもつリンパ濾胞が目立つ。



### ◎ 軟骨

RAの代表的な疾患病変は軟骨・骨の破壊である(図8)。しばしば破壊という言葉で表現されるが、組織像をみていると破壊というよりまさに吸収である。軟骨の特性はいくつかあるが、骨と大きく異なるのは血流に接すると変性を起こしやすくなることである。

軟骨を吸収する因子としては炎症性肉芽組織であるパンプスの浸潤、軟骨表面から攻撃する関節液中の蛋白分解酵素<sup>9-12)</sup>、軟骨細胞自らのアポトーシス<sup>13,14)</sup>などがあげられる。さらに、一定の変性が起ると、これに荷重などの物理的負荷が加わり軟骨は変性、消失していく。パンプスからは

図8 RAの軟骨・骨破壊部



軟骨表面を這うように炎症性肉芽組織(パンプス)の浸潤がみられる。パンプスは軟骨表面から深く浸潤し、骨を破壊し、骨髓に至る。

さまざまな蛋白分解酵素が産生され、アポトーシスの誘導にはFasなどの因子が関与する<sup>14)</sup>。

関節液中には好中球をはじめとする多くの炎症性細胞や、この炎症性細胞から放出された蛋白分解酵素などが検出される<sup>9-12)</sup>。特に最近ではコラゲナーゼなどのmatrix metalloproteinase(MMP)群が注目されており、またこれらを活性化するTNF $\alpha$ 、IL-1などのサイトカインも関節液中には多量に含まれている(図9)<sup>15-18)</sup>。

### ● 骨破壊

関節が破壊される経路には大きく2つあるよう

に思われる。1つはパンヌスが軟骨表層を這うように進んで軟骨を吸収し、その下にある骨(軟骨下骨)を侵食する経路(図8)。もう1つはbare areaといわれる軟骨や滑膜から骨膜への移行部ではじまった炎症が、軟骨の下を經由して骨、骨髓へ浸潤していく経路である(図6, 10)。

ここで問題になるのは骨を破壊する因子である。一般には破骨細胞の関与がよく知られているが(図11)、このほかに単球系の前破骨細胞あるいは紡錘形の形をした線維芽細胞様細胞(fibroblast like cell; FLC)(図12)などが骨破壊に関与する因子としてよく知られている。このFLCはRAを代表す

図9 RAでのTNF $\alpha$ 蛋白

a: 滑膜組織, b: 骨破壊部  
いずれにおいてもTNF $\alpha$ 陽性細胞(↑)が多数認められる(茶褐色)。ここで産生されたTNF $\alpha$ が関節液や血中に入る。陽性細胞は滑膜細胞や破骨細胞のほかにも多彩であり、これらの細胞ではほかにもIL-1やIL-6などのサイトカインが陽性となる。

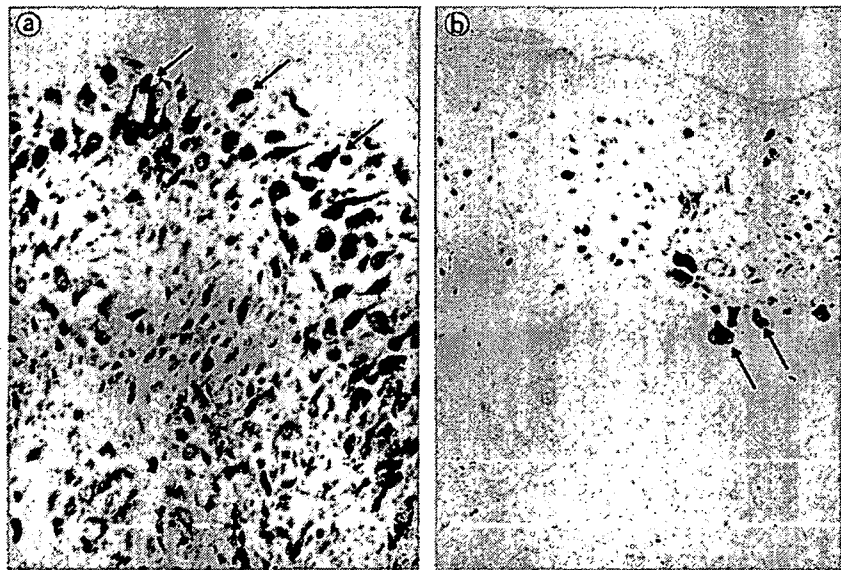
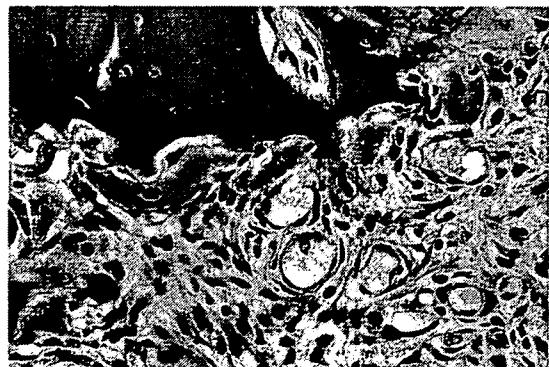


図10 RA患者手指/矢状断



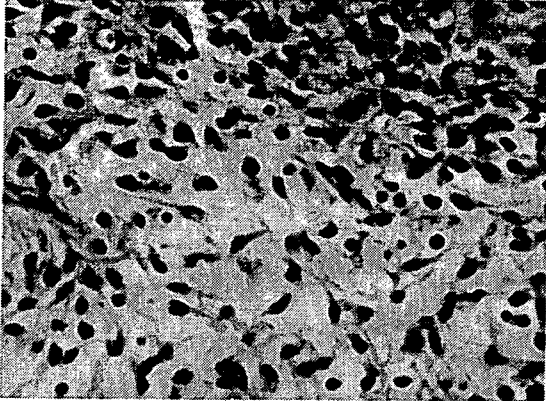
遠位指節間関節で、右側が遠位側である。軟骨表面には障害が少ないが、骨と滑膜の付着部(特に左側の骨)付近から骨髓内に炎症性の肉芽組織(パンヌス)が浸潤し、高度な骨破壊が認められる。

図11 RA典型例のパンヌス



RA患者の骨破壊部のパンヌスで、骨縁に沿って多くの破骨細胞が認められる。

図12 FLCの増殖



RAの骨破壊部周囲には図11のような破骨細胞がみられるほかに、紡錘形のFLCが認められる。

図13 RA滑膜組織におけるCD14+細胞

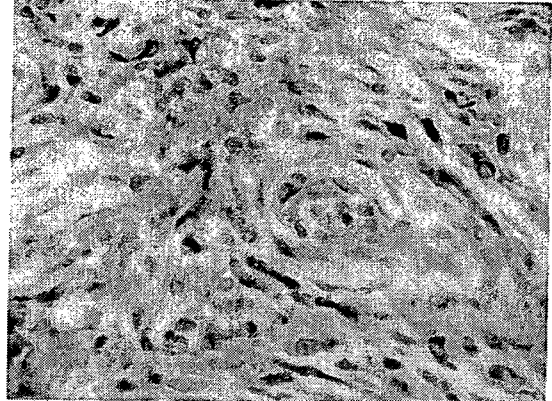
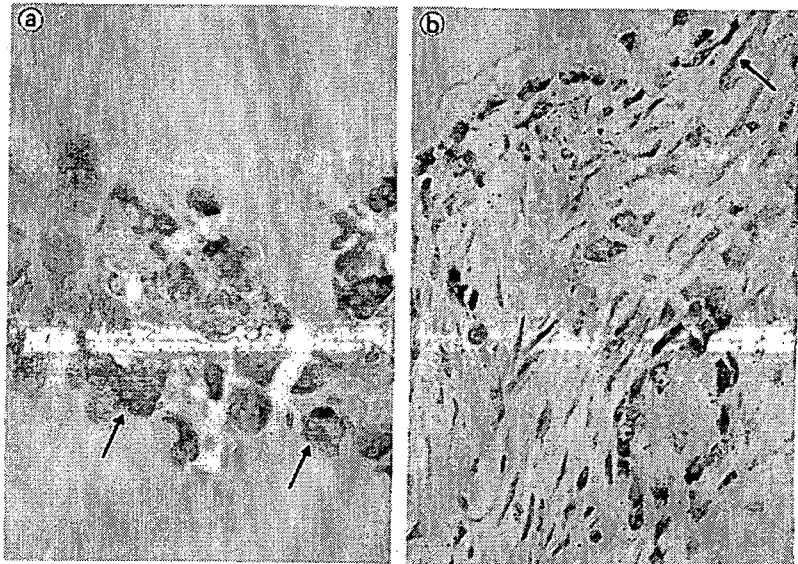


図12のような紡錘形の線維芽細胞様細胞ではHLA-DRのほかにもCD14などのマーカーが陽性となる。

図14 RA患者の骨破壊部でのmatrix metalloproteinase (MMP)-9

a, b: RA患者の骨破壊部ではaのように破骨細胞が陽性となる(↑)ほかに、bのような紡錘形細胞もMMP-9が陽性となる(↑)。これらの細胞ではほかにも多くの蛋白分解酵素が陽性となる。



る特徴的な細胞であり、HLA-DRやCD14(図13)のほか、さまざまな蛋白分解酵素(図14)やサイトカインを発現する。形態学的には多彩であり、電子顕微鏡的には粗面小胞体が豊富で線維芽細胞に類似しているものもあれば、突起やライソソームを有し、マクロファージ様の細胞もみられる。いずれにせよ通常の線維芽細胞とは異なるとされているが、現在、その病態への関与の意義が追究されている。この細胞に類似した細胞は非特異的な慢性滑膜炎でもしばしばみられるが、その数の多さや生き生きとした細胞像からみると、やはりRAを

特徴づける細胞といえる。

骨破壊については、これまであげたパンヌスの関与が大きいですが、その他に循環障害などの影響も指摘されている(図15)<sup>19)</sup>。炎症の際には血管の新生が目立ち、関節域を流れる血流も多くなるが、炎症が鎮静化し、線維化や瘢痕化に至ると、血管が線維化のなかに埋没したり、閉塞が起こったりして、必ずしも循環に対して有利な状況ではなくなってくる。このような場合、骨の萎縮やempty lacunaeを伴った骨壊死がしばしばみられる。

図15 RAの壊死骨周囲の動脈の閉塞



炎症が鎮静化し、線維化に至った部位では、血管が線維化のなかに埋没し、狭窄や閉塞を示すことがある。結果として、骨萎縮やempty lacunaeを伴った骨壊死がしばしばみられる。

[宇月英和ほか：関節リウマチにおける軟骨・骨破壊の病理学的特徴。CLINICAL CALCIUM, 17 : 474-483, 2007 (図10)より転載]

また、荷重も骨に対して大きな変化をもたらす。炎症などによって半月板や軟骨が吸収され、靭帯の損傷が加わると荷重に対する力学的バランスが崩れて関節面への負荷が不均一になる。その結果、軟骨は摩耗してクッション作用を失い、関節裂隙は狭小化し、向かい合わせの骨表面は摩耗して刃物で研いだように平らになると同時に反応性の骨形成が亢進した結果、象牙質を呈するようになる。この変化はむしろ変形性関節症(osteoarthritis ; OA)の特徴であるが、RAでも膝、股などの荷重関節ではOA様の像を示すようになる。

また、局所的に骨増生がみられる一方で、骨梁は細くなり、骨粗鬆症の状態になる。これは炎症による破骨細胞の活性化に伴う骨吸収の亢進、疼痛のために動かなくなることによる廃用萎縮、ステロイドなどによる薬剤性骨粗鬆症、それに加齢や栄養状態など多くの因子が関与する。また、一般に高齢者では骨端の骨髓は脂肪に置換され(脂肪髄)、骨髓細胞はほとんどみられなくなる。

このようにRAの関節破壊は滑膜にはじまり、

軟骨、骨を吸収し、関節を破壊し、機能障害に至る。

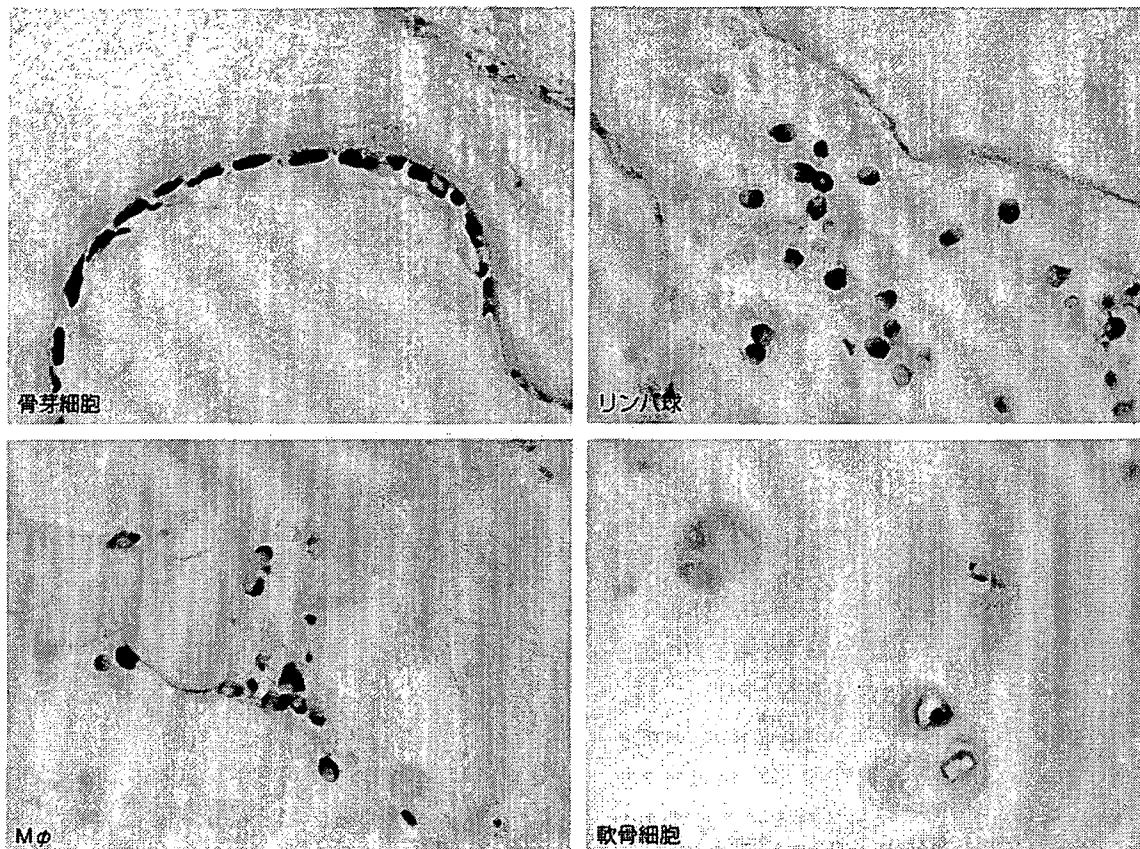
#### ● 滑膜の炎症と骨破壊の関係

今まで述べてきた滑膜の炎症と軟骨・骨吸収の関係はマクロ的にみると近接した部位で起こっていることであるが、組織あるいは機序という面からみるとまだまだ多くの問題が残されている。滑膜の炎症と骨破壊の関係が必ずしもパラレルではないからである。この問題は、治療における最終目標となる骨破壊の進行を止めるには滑膜の炎症を抑制するのがいいのか、あるいは滑膜の炎症とは別の機序を考慮していく必要があるのかということにもつながる。

RAの根本的な原因に対する治療は別として、直接的に考えると破骨細胞の機能を分化誘導も含めて抑えることが一番有効であろうか。破骨細胞の分化誘導因子としてはRANKLあるいはさまざまなサイトカインがあるが、そのなかで最近最も注目されているのはTNF $\alpha$ である(図9)。これらの因子は破骨細胞だけではなく、さまざまな細胞で産生されており(図16)<sup>16)</sup>、サイトカインを抑制することによって炎症性細胞自体のアポトーシスを誘導している可能性もある<sup>20)</sup>。しかし、Yoshimuraらによる培養系での実験ではTNF $\alpha$ 単独でのアポトーシス誘導作用は弱く、ほかの因子と協調してアポトーシスを誘導する作用を発揮するという報告もあり、TNF $\alpha$ の存在は関節破壊に対して必要条件であっても十分条件ではない場合も考えられる<sup>21)</sup>。

一方、骨吸収は破骨細胞だけで行われるものではない。関節炎の組織を観察するとRAは非RAの組織に比較してFLC(図12)の増殖が特徴的であり、このFLCがRAの骨吸収に関与しているのではないかと思われる。RAを代表する滑膜の組織像というと、リンパ濾胞や滑膜の絨毛状増殖がよく知られているが(図17)、筆者らはRAの最も大きな特徴はFLCの増殖ではないかと考えている。この細胞は紡錘形で線維芽細胞様でもあるが、電顕で観察するとライソソームを保有しており、cathepsin Lなどの蛋白分解酵素を産生している一方、MMP-9などの非ライソソーム型の蛋白分解酵素も認められ<sup>22)</sup>、

図16 骨周囲のRANKLの発現

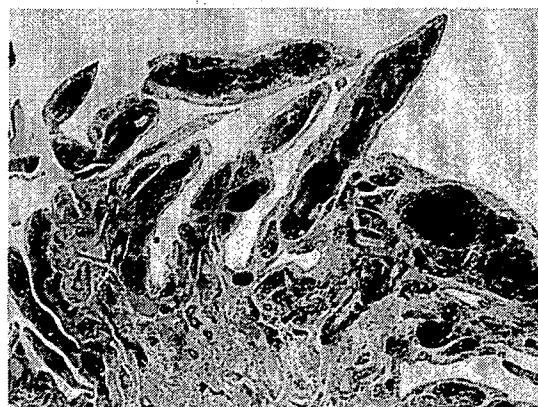


破骨細胞の分化・誘導にかかわるRANKLは、骨芽細胞以外にもリンパ球、マクロファージ、軟骨細胞などでも陽性となる。  
 [宇月美和ほか：関節リウマチにおける軟骨・骨破壊の病理学的特徴。CLINICAL CALCIUM, 17: 474-483, 2007 (図13)より転載]

この細胞が直接あるいは間接的に骨破壊に関与していることは間違いない。このFLCは骨髄にあるCD34陽性のnurse cell由来であり<sup>23,24)</sup>、骨破壊に関与するという報告もある。それならば、さまざまなサイトカインや蛋白分解酵素と同様にこの細胞を特異的にたたくことが、RAの治療につながるものと思われる。

現在、RAの炎症は免疫異常を基礎とした炎症と非特異的炎症に分けることができる。極論すると前者を代表とした炎症はリンパ球を中心としたものであり、後者は顆粒球を中心とした炎症といえるが、後者の肉芽組織が直接的には骨吸収に作用しているのではないと思われる。この非特異的な肉芽組織の活性を抑え、ここに含まれるサイトカイン、蛋白分解酵素の産生を抑えることが骨吸収の抑制につながる治療の1つになるものと思われる。

図17 典型的なRA滑膜組織像



典型的なRA滑膜組織では図のような滑膜の絨毛状増生やリンパ球浸潤、血管の増生やリンパ濾胞の形成が高度に認められる。



以上、病理組織学的な面からみた軟骨、骨破壊を取り上げてきたが、現在、いまだはっきりしていないのが滑膜炎の炎症から軟骨、骨吸収に至る経路である。この点についてはFLCを中心とした詳細な分析が今後の課題といえる。

### 膠原病の関節炎

関節炎は多くの自己免疫疾患にみられる病変であるが、RAを除けば関節周囲の軟部組織の炎症が強く、骨破壊をみることはまれである。

RAに似た滑膜炎が証明されることがあるが、一般に骨侵食やパンサスの形成はみられない。骨のerosionはMRIでかろうじてわかる程度か、まったくみられないといわれるが、まれに骨破壊の報告もある<sup>25)</sup>。臨床的には軽度の関節痛からJaccoud変形のタイプまでで、これは靭帯や関節包の弛みによる変形であり、実際の骨破壊は少ない。

全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus; SLE)、全身性硬化症(systemic sclerosis; SSc)、混合性結合組織病(mixed connective tissue disease; MCTD)にしても病理組織学的に滑膜炎の炎症が指摘されるが、炎症は軽度であり、RAほど高度の骨破壊を伴うことは少ない

図18 SLEの滑膜組織像



SLEなど、RA以外の膠原病でも関節炎がみられるが、病理組織学的には滑膜炎の炎症は軽度であり、骨破壊を伴うことは少ない。

1356(16)

(図18)。むしろ、周囲の被膜、靭帯の炎症とその後続く線維化による無理な力が加わり、亜脱臼などの変形をみるのが特徴である。

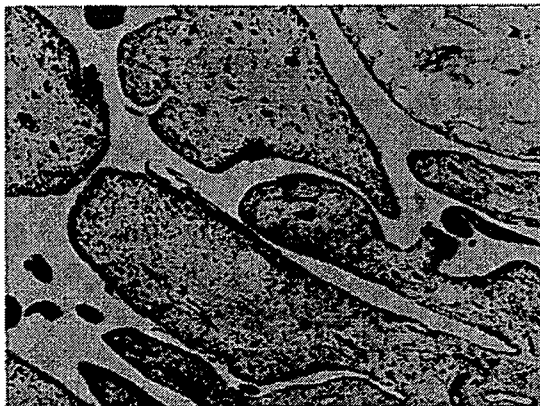
### OA

OAでは、加齢や荷重などの物理的な負荷によって関節のバランスが崩れ、軟骨の摩耗、変性、消失、反応性の骨硬化や骨棘の形成がみられる。変性疾患のなかに入れられてはいるが、病態は複雑である。現在、わが国では四肢関節、脊椎も合わせると700~1,000万人の患者および予備群がいるとされ、今後、高齢化社会の進行とともに医療面だけでなく、大きな社会問題になるとと思われる疾患である。

OAの変化で特徴的なのは、滑膜炎の線維化や浮腫と軟骨、骨の破壊であり、疼痛によって関節の運動は制限され、特に膝関節では多量の関節液が貯留する。

病理組織学的には滑膜炎の細胞の多層化傾向は少なく、1層あるいはせいぜい2~3層である。表層下では浮腫と血管の拡張が目立ち、やや血管が増生しているような印象も受ける(図19)。このときの血管は電子顕微鏡で観察するとプロテオ

図19 OAの滑膜組織像



滑膜炎の細胞の多層化は目立たず、2~3層にとどまる。表層下には浮腫や線維化と血管の拡張が目立つほか、やや血管が増生している。

グリカンなどからなる同心円状の層構造を形成している。炎症性細胞については、リンパ球がごく一部に集簇し、濾胞を形成する像もみられる。一般にはT細胞の集簇からなり、胚中心を形成することは少ないが、なかにはリンパ球浸潤が目立つ滑膜組織もある。長年経過したOA患者の滑膜でも高度の炎症性細胞浸潤や強い線維化をみることは少ない。

一方、OAの軟骨・骨病変については、軟骨表面の毛羽立ち現象(fibrillation)からはじまり、亀裂(cleft)、プロテオグリカンの脱失と線維構造が現れ、やがて軟骨は失われていく。

骨についてはRAでも述べたように、対面の軟骨同士が摩耗し消失すると、骨が露出し、平らになる。OAの骨変化で知られているのは、軟骨が消失し中央部の骨が剥き出しになる象牙質化(eburnation)と反応性の骨増生(osteosclerosis) (図20)、辺縁部におけるosteophyteの形成である。

OAというと一方的に軟骨、骨破壊が進行しているように思われるが、fibrocartilaginous plugやchondrocytic cloning, osteophyteなど反応性の増生も目立ち、局所的にみると増殖性病変であるという捉え方をする医師もいる。

## その他の疾患

### ※ 化膿性関節炎

滑膜での炎症が主体であり、それが慢性化してやがて骨の侵食に及ぶ。細菌などの感染に起因するもので、炎症の最盛期には好中球の浸潤が目立つが(図21)、最近では抗生剤投与後に滑膜が採取されることが多いため、好中球の浸潤はそれほど目立つわけではない。RAの滑膜では、好中球の浸潤がsubliningに目立つのに対し、本疾患ではびまん性の好中球浸潤をみる。最近ではステロイドの投与に関連してみられることがある。

図20 OA患者の大腿骨頭

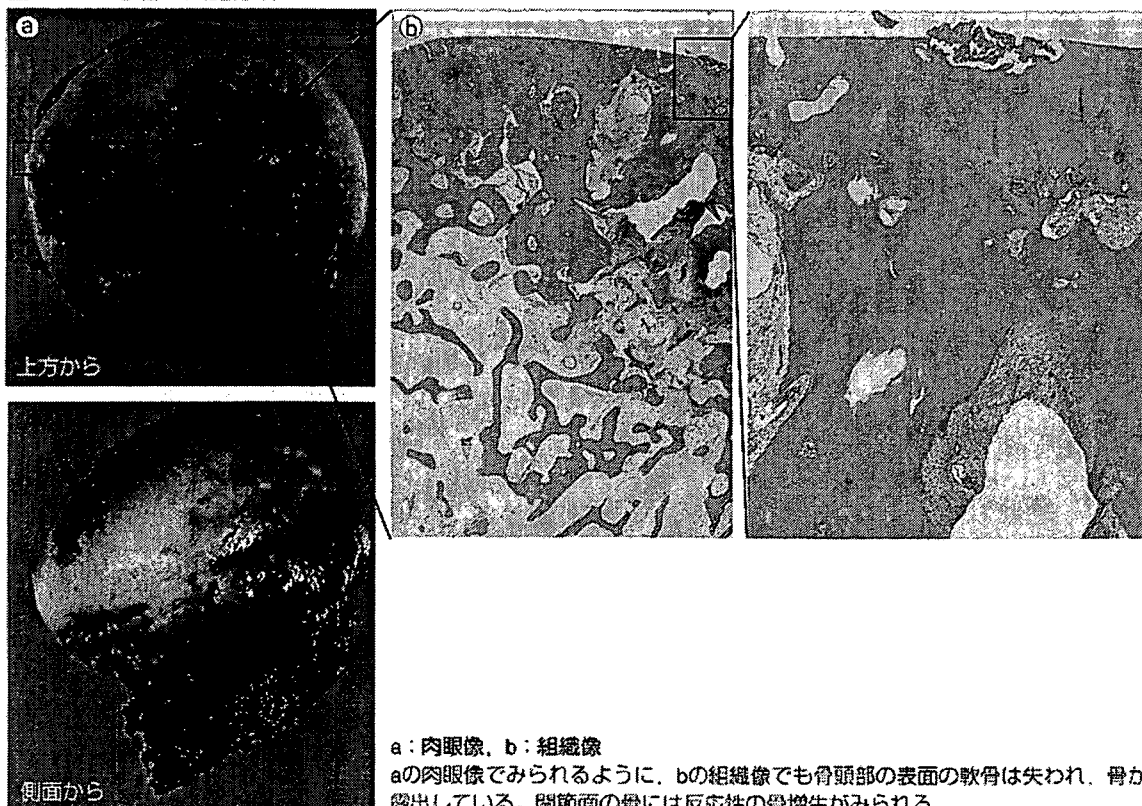
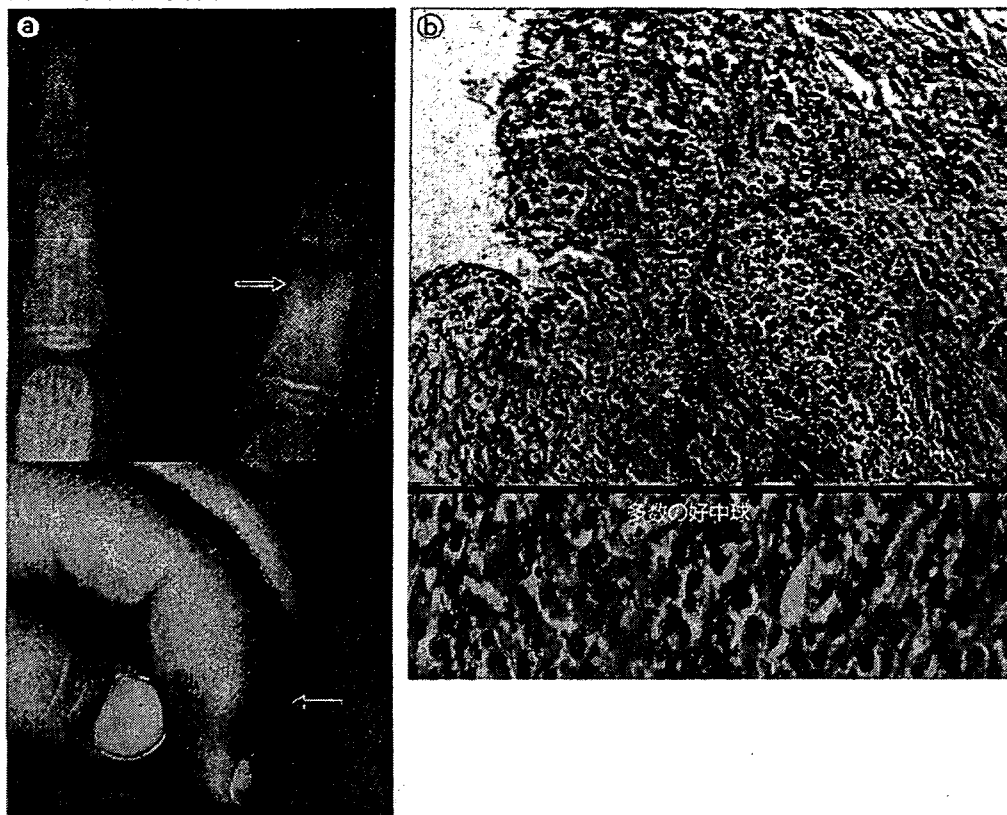


図21 化膿性関節炎



細菌感染による関節炎である。

a: X線像、肉眼像

肉眼的には発赤や腫脹、熱感がみられる(1)。

b: 滑膜組織像

びまん性で高度な好中球浸潤が認められる。

### ※ 神経障害性関節炎(Charcot型関節炎)

Charcot型関節炎ともいわれ、骨破壊が高度であるのに対し、疼痛を感じる事が少ない。滑膜組織では、炎症性細胞浸潤はそれほど目立たず、bone fragmentとこれに対する異物反応であるマクローファージの浸潤がみられる。

### ※ 結晶性関節炎

#### ● 痛風

痛風は代謝異常やプリン体の過剰摂取によって引き起こされる高尿酸血症を基礎として、尿酸結晶の沈着による滑膜炎と腎障害を引き起こす疾患で、20歳以上の男性に多い。滑膜では、尿酸結晶の沈着と、それに対する異物型巨細胞の反応、結晶物の貪食を認める(図22)。この結晶に反応するマクローファージが種々の蛋白分解酵素を放出し、

それに伴って骨の破壊が亢進する。なお次に述べる偽痛風との違いは、偽痛風の結晶が長斜方形であるのに対し、本疾患では針状であることである。

#### ● 偽痛風

偽痛風はピロリン酸カルシウムの沈着によりOA様の変化を示し、関節周囲に腫瘤状あるいは結節状の結晶沈着を認める。X線像では肉眼像を反映して半月板や関節軟骨に石灰化巣が点状に認められる。偽痛風でも、ピロリン酸カルシウム結晶に対する反応によって滑膜炎の炎症が起こり、関節の破壊が進行する。結晶の特徴は痛風と違い長斜方形である(図23)。

#### ※ 無菌性壊死

画像では初期は発見が困難であるが、進行とと

図22 痛風の組織像

50歳代、女性。

a: 肉眼像

関節周囲の軟部組織には白色の結晶沈着がみられる(1)。

b: 組織像

尿酸結晶からなる結節の周囲に異物型巨細胞を伴った炎症性変化がみられる。結晶は針状を示す。

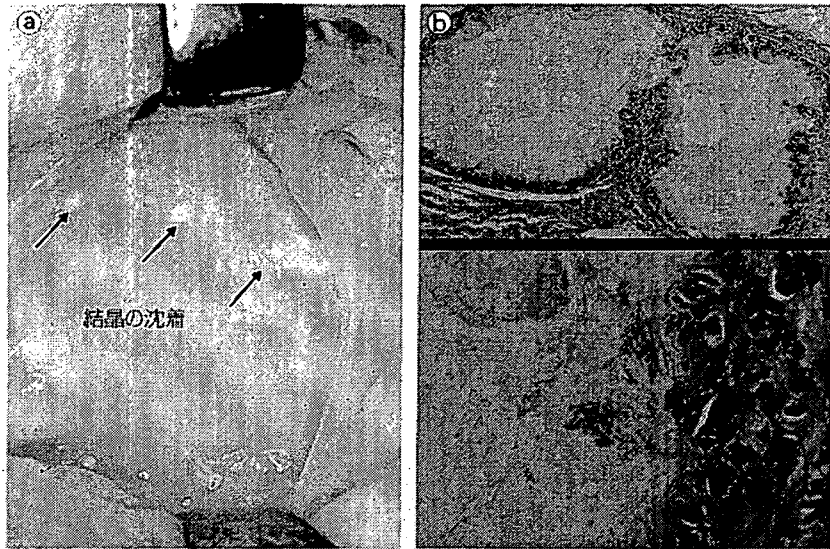


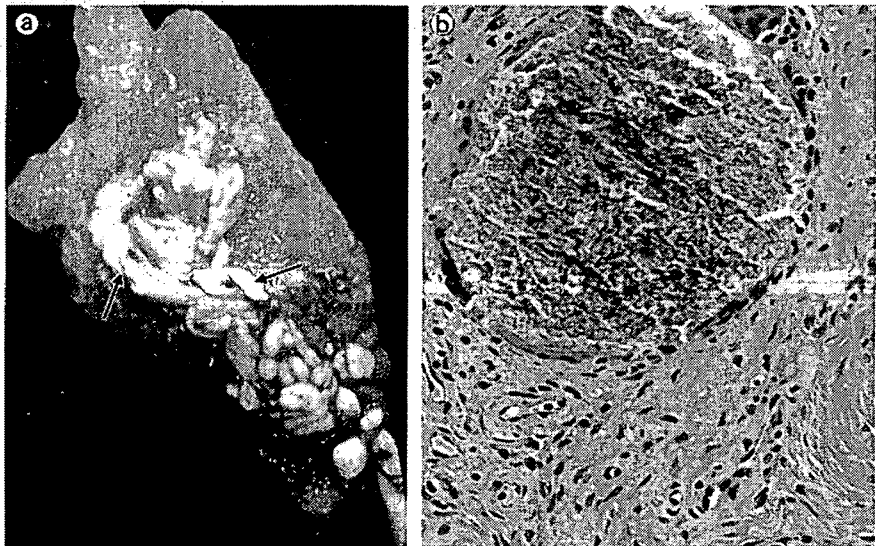
図23 偽痛風

a: 肉眼像

半月板組織内に白色の結晶沈着がみられる(1)。

b: 組織像

結晶は痛風と異なり針状ではなく長斜方形である。



もに点状、斑状の硬化像と透亮像、関節軟骨下の三日月状の透亮像(crescentic sign)、さらには骨頭の扁平化や圧潰がみられる。大腿骨にみられる無菌性壊死は循環障害を示唆する骨の梗塞像である。その特徴はempty lacunaeといわれる所見であり、骨細胞が壊死に陥って核がみられなくなる。これは主に動脈硬化、ステロイドの使用などによるものと推定される。

baseとしているのに対し、本疾患ではOAを基礎として小骨折を繰り返すことによって反応性の炎症を引き起こし、急速に骨の破壊が進行する。滑膜像の特徴は高度の血管新生を伴う肉芽組織の形成である<sup>23)</sup>。また、無菌性壊死が梗塞様の広範囲な壊死、梗塞であるのに対し、本疾患は吸収と新生の混在する像が認められる。

### ※ 急速破壊型股関節症

無菌性壊死に類似してしばしば同じような病態として扱われるが、前者が明らかな循環障害を

### ※ 色素性絨毛結節性滑膜炎

MRIではヘモジデリン沈着による低信号を示し、造影では不均一な増強効果がみられる。滑膜は絨毛性増殖傾向を示し、組織学的にはマクロフ

アージの結節性の集簇を示すが、特に出血によるヘモジデリンの沈着と貪食が目立つため、滑膜の色は赤褐色(さび色)を呈する。本疾患については、一般には炎症による増殖性病変とする見方と腫瘍性病変とする見方がある。

### 将来の画像診断に期待すること

以上、RAを中心に画像でみられる関節病変を記載してきた。これからは画像の進歩と非観血的な診断法への移行は明らかであり、RAのような直接的に死亡の原因とならない疾患において、関節から滑膜を採取して初期病変を観察することは不可能となってきた。したがって、文中でも述べたが、RAの初期病変がどこで、どのような形ではじまり、血管の増殖や血流の変化とどのように関連しつつ進行していくかということ、さらに、最近注目されている骨髓浮腫の本体は何かということなどについては、どこかで組織像との付き合い合わせは必要であるものの、今後はMRIを参考にしながらみていくべきではないかと思われる。そういう意味では画像の進歩に期待するところは大変大きいですが、機器の進歩とともに画像が一層正確に読まれるようになるためには、動物モデルやヒトの疾患と対比しながら十分なデータベースを構築していくことが必要である。

### 謝辞

本稿を終えるにあたって、貴重な患者試料のご提供をいただいた東北大学医学部、東北労災病院、鳴子温泉病院(旧：国立鳴子病院)、東北厚生年金病院、岩手医科大学、独立行政法人国立病院機構盛岡病院(旧：国立療養所盛岡病院)、昭和大学に深謝いたします。

### Tips & Tips

#### 生物学的製剤による治療の影響

- ・最近、RAに対して抗TNF $\alpha$ 抗体などの生物学的製剤による治療が行われている。症例によっては劇的な効果を示すため、RAとして提出された手術検体でも、ほとんど炎症性変化の認められない滑膜組織もみられる。むしろ、教科書的な組織像を示すRAのほうが少なくなり、chronic synovitisとしか診断できないものも多し。
- ・悪性腫瘍の場合には治療効果の評価などの面から治療後の組織像のデータも蓄積されているが、こういったものがRAでも必要となるかもしれない。

### 文献

- 1) Abu-Hijleh G, et al : Cell death in the developing chick knee joint : I. Spatial and temporal patterns. *Clinical Anatomy*, 10 : 183-200, 1997.
- 2) 日域淳一郎 : 損傷半月板修復における遊離滑膜移植の治癒促進効果に関する実験的研究. *広島大学医学雑誌*, 40 : 423, 1992.
- 3) 岩田 久, 新名正山編 : 関節マーカー. メジカルビュー社, 東京, 1997.
- 4) 松井利浩 : 関節リウマチと抗シトルリン化タンパク抗体. *日本臨床免疫学会会誌*, 29 : 49-56, 2006.
- 5) Tanaka M, et al : Autoimmune reaction to type II collagen and cartilage degeneration in MRL/Mp-lpr/lpr mouse. *Rheumatol Int*, 24 : 84-92, 2004.
- 6) Yoshida M, et al : Development of large pseudocysts adjacent to the knee joint in rheumatoid arthritis—Assessment of radiological and histopathological approaches. *Mod Rheumatol*, 12 : 128-133, 2002.
- 7) 澤井高志ほか : 慢性関節リウマチ滑膜初期病変の免疫組織化学的検討—モノクロナル抗体を用いた炎症性細胞の定性ならびに定量的解析—. *リウマチ*, 30 : 247-254, 1990.
- 8) 澤井高志ほか : 慢性関節リウマチ(RA)の滑膜組織におけるICAM-1とLFA-1の発現に関する免疫組織化学的研究. *リウマチ*, 34 : 854-862, 1994.
- 9) Maeda S, et al : Determination of interstitial collagenase (MMP-1) in patients with rheumatoid arthritis. *Annals Rheum Dis*, 54 : 970-975, 1995.
- 10) 伊藤 崇ほか : 慢性関節リウマチ血清、関節液中のMatrix Metalloproteinase (MMP)-13の動態. *リウマチ*, 42 : 60-69, 2002.
- 11) Seki M, et al : Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) in patients with rheumatoid arthritis. *Jap J Rheum*, 7 : 197-209, 1997.
- 12) Sawai T, et al : Stromelysin synthesizing cells in the synovial tissues of rheumatoid arthritis demonstrated by *in situ* hybridization and immunohistochemical methods. *Tohoku J Exp Med*, 160 : 285-586, 1990.
- 13) 大内修二ほか : 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*, 16 : 280-285, 2004.
- 14) Uzaki M, et al : Apoptotic chondrocyte death and matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 43 : S386, 2000.
- 15) 斎藤隆幸ほか : RA患者の血清、関節液、関節組織にお

- けるTNF $\alpha$ の動態. 炎症, 14: 143-150, 1994.
- 16) 澤井高志ほか: 炎症における蛋白分解酵素・サイトカインの発現について. 病理と臨床, 10: 1033-1040, 1992.
- 17) 深町知博ほか: 慢性関節リウマチにおけるIL-6レセプターの動態—血清, 関節液, 滑膜組織での検討—. 炎症, 14: 489-497, 1994.
- 18) 宗像孝佳ほか: 慢性関節リウマチにおけるInterleukin (IL)-18の動態. リウマチ, 41: 625-634, 2001.
- 19) 宇月美和ほか: 関節リウマチにおける軟骨・骨破壊の病理学的特徴. CLINICAL CALCIUM, 17: 474-483, 2007.
- 20) Matsuno H, et al: Treatment of rheumatoid synovitis with anti-reshaping human interleukin-6 receptor monoclonal antibody: use of rheumatoid arthritis tissue implants in the SCID mouse model. Arthritis Rheum, 41: 2014-2021, 1999.
- 21) Yoshimura F, et al: Downregulation of inhibitor of apoptosis proteins in apoptotic human chondrocytes treated with tumor necrosis factor-alpha and actinomycin D. Osteoarthr Cartil, 14: 435-441, 2006.
- 22) 松本不二夫ほか: 急速破壊型股関節症(RDC)における関節組織でのMatrix Metalloproteinases (MMPs), Tissue Inhibitor of Metalloproteinases (TIMPs)の発現について—滑膜組織と骨破壊部の免疫組織化学的解析—. リウマチ, 37: 688-695, 1997.
- 23) Hirohata S, et al: Induction of fibroblast-like cells from CD34+ progenitor cells of the bone marrow in rheumatoid arthritis. J Leukoc Biol, 70: 413-421, 2001.
- 24) Hirohata S, et al: Enhanced expression of mRNA for nuclear factor  $\kappa$  B1 (p50) in CD34+ cells of the bone marrow in rheumatoid arthritis. Arthritis Res Ther, 8: R54, 2006.
- 25) Schumacher HR Jr: Synovial fluid analysis and synovial biopsy. Textbook of Rheumatology, 5th edition, Kelley WN, et al, ed. WB Saunders, Philadelphia, 1997, p609-625.

## 関節リウマチ患者の関節内での ヒアルロン酸分解酵素 (hyaluronidase) の発現と分布について

徳永勢二<sup>1), 2)</sup>, 宇月美和<sup>1)</sup>, 鎌滝章央<sup>1)</sup>,  
貝山 潤<sup>2)</sup>, 鳴村 正<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 岩手医科大学医学部, 病理学第 1 講座

<sup>2)</sup> 岩手医科大学医学部, 整形外科学講座

(Received on January 12, 2007 & Accepted on January 29, 2007)

### 要旨

3 種類のヒアルロン酸 (HA) 分解酵素 (hyaluronidase; Hyal-1, 2, 3) について関節リウマチ患者 (RA) の関節内における発現状態を検討した。対象は手術時や関節内穿刺時に得られた RA 患者の関節液 46 例, 滑膜組織 17 例であり, zymography と *in situ* hybridization (ISH) を用いて関節液中の hyaluronidase 活性と滑膜組織中の mRNA の発現の程度を検討した。関節液中の hyaluronidase 活性の高い

症例では関節液中の HA 分子量は低下していた。滑膜組織では RA の初期例や活動期例の滑膜表層細胞において Hyal-1, 2, 3 の mRNA 陽性細胞の高度の発現を認めた。RA 患者の関節内の HA は滑膜組織と関節液中に存在する hyaluronidase によって分解され, その結果, 分子量や濃度の低下が生じ, 粘度の減少が起こっていることが証明された。

**Key words :** rheumatoid arthritis, hyaluronic acid, hyaluronidase, zymography, *in situ* hybridization

### I. 緒 言

関節リウマチ (rheumatoid arthritis; RA) は多発性の関節炎を主症状とする全身性の難治性炎症性疾患で, 病変の主座は関節滑膜である。朝のこわばりを特徴とし, 関節の疼痛と腫脹で発症し, 軽快と増悪を繰り返して最終的には関節破壊に至り, 関節の変形, 機能障害を来す。その組織学的な特徴として, RA 患者の関節滑膜では表層細胞の増殖および表層下におけるリンパ球, 形質細胞, マクロファージなどの炎症性細胞の浸潤や, 滑膜組織の絨毛状の増生が見られる<sup>1, 2)</sup>。関節液では健康者に比較して好中球を主体とした白血球が増加し, RF 因子の陽性化, 補体価の低下, またムチンと呼ばれるヒアルロン酸-蛋白複合体の減少に伴う粘稠度の低下が認められる。粘稠性を生じるために大きな役割を

持つヒアルロン酸 (hyaluronic acid; HA) は関節液の他に滑膜, 軟骨など様々な関節内組織に存在することが証明されているが, RA 患者の関節内では HA の動態にも変化が生じることが報告されている<sup>3-5)</sup>。

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幅広く生体内に存在している。HA は物性的に高い粘弾性と保水性を有することから関節内では潤滑と衝撃緩和作用の役割が指摘されているが, 一方でその分子量に応じて異なる生物学作用を持つことが近年明らかにされてきている。高分子 HA では NF- $\kappa$ B などのサイトカインを抑制し, 炎症を抑える作用や血管新生を抑制する作用が認められる一方で, 低分子 HA ではサイトカインの

誘導, 炎症や血管新生の亢進などまったく正反対の作用を持つとされている<sup>6-8)</sup>. RA患者の関節液中のHA分子量や粘度を計測すると, 健常者に比較して低値を示すことが知られているが<sup>3,9)</sup>, それによって, 関節液としての機能低下(粘弾性の低下)の他に低分子HAによって惹起される炎症の活性化がもたらされる可能性が考えられる. HAの生体内での代謝は非常に速いが, そのメカニズムの詳細は明らかになっていない. 生体内HAの50%を含む皮膚では, HAの半減期は約一日で, 軟骨のように見かけ上不活性な組織でさえ半減期は1~3週間であり, 血流中では半減期は2~5分と非常に短い<sup>4)</sup>. そしてこのような異化作用の多くはhyaluronidaseによるものであると考えられている. hyaluronidaseはヒトではhyaluronidase (Hyal) -1, 2, 3の他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hyaluronidase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hyaluronidaseである. もうひとつ広く発現し酸性条件下で活性を持つHyal-2はglycosylphosphatidylinositol- (GPI) 結合によって原形質膜と結合しており, 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持つ. 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後にエンドソームに運ばれ, 最終的にリソソームに運ばれる. リソソーム中のHyal-1はHAを小さな二糖に分解し, さらにこの二糖は $\beta$ -N-アセチルグルコサミニダーゼによって分解される. 関節液中のヒアルロン酸の低分子化も関節内のhyaluronidaseによって起こっていると考えられるが, 現在ヒトRA患者の関節内での病態と関連したhyaluronidaseについての報告はない.

今回我々はRA患者の関節液中のhyaluronidase活性についてzymographyを用いて定量化し, 同一患者の関節液中のHA分子量や滑膜組織のhyaluronidase陽性細胞の発現数, 分布との相関について検討した.

## II. 対象および方法

### 1. 対象

人工膝関節全置換術, 滑膜切除術及び関節腔穿刺などの際に患者の同意を得て採取したRA患者の関節液46例 [男性10例, 女性36例, 平均年齢63.9歳 (38~83歳)] と, 滑膜組織17例 [男性2例, 女性15例, 平均年齢61.5歳 (42~83歳)] を用いた. そのうち同一患者, 同一関節からの検体は12例含まれていた. 患者のSteinblockerによるstageおよびclass分類, その他の臨床データについて確認はしたものの, 今回は滑膜組織について早期, 活動期, 線維化期などのRooneyによる滑膜の組織学的炎症度のstage分類<sup>10)</sup> だけを対象とした. 関節液は採取後3000回転で10分間遠心して, 上清を分取し, -80℃で保存した. 滑膜組織は採取後4% paraformaldehyde/PBSにて2時間固定(室温)後パラフィン包埋され, 4℃で保存されたものを使用した.

### 2. 関節液中のHA分子量の測定

関節液中のHA分子量の測定はGPC-MALLS法で行った<sup>11)</sup>. 以下, 方法について簡単に述べる.

1) 前処理として, 関節液を大塚蒸留水で10倍に希釈した後, Proteinase K (Roche社, Mannheim, Germany) を終濃度で100  $\mu$ g/mlとなるように加え, 40℃にて24時間酵素処理した. 処理後, HA濃度が0.005~0.010%の範囲(Morgan-Elson法により測定したHA濃度の値を参考にして計測)になるように0.2M NaNO<sub>3</sub> (0.02%アジ化ナトリウムを含む) で希釈した後, 0.22  $\mu$ mフィルター DISMIC-13cp (ADVANTEC社, 千葉) でろ過し, 試料とした.



## 2) 分析方法

表1に示したGPC-MALLS法で試料中のHAの分子量を分析した。分子量(重量平均分子量)は、GPCでサイズ分離したHAを連続的に濃度(RI検出器)と分子量(光散乱検出器)を測定し、GPCの平均分子量を求める方法で平均化して求めた。

3. zymography<sup>12-15)</sup>

zymographyは8%ポリアクリルアミドゲルに分子量80万相当の合成HA(電気化学工業(株)より供与)を0.17mg/mlとなるように添加し、native-PAGEによって関節液中のhyaluronidase活性の検討を行った。関節液の調整は以下の如く行った。ヒト関節液10 $\mu$ lに2 $\times$ sample buffer 10 $\mu$ l [1 M Tris (pH 6.8) 1.25 $\mu$ l, glycerol 2 $\mu$ l, 0.2% bromphenol blue 5 $\mu$ l, H<sub>2</sub>O 1.75 $\mu$ l]を加え、計20 $\mu$ lのサンプルを作成した。4 $^{\circ}$ C, 25mA/gelで90分間電気泳動を行った。泳動後、ゲルを酵素反応液[0.2M ammonium acetate (pH 4.0)]に浸し、37 $^{\circ}$ Cで16時間インキュベートした。次に0.1mg/ml Pronase solution (20mM Tris-HCl, pH 8.0)にて37 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートし、その後20% ethanol, 10% acetic acid溶液で20分洗浄した。最後にAlcian blue染色液[0.5% Alcian blue, 20% ethanol, 10% acetic acid溶液 (pH 2.5)]で1時間染色した。HA添加ゲルは全体が青く染色されるが、hyaluronidaseによって分解された領域はAlcian blueによる染色性が低下し、白く抜けたバンドとして検出される。また、蛋白の泳動パターンの確認のために同一検体を泳動したゲルをもう1枚作成しCoomassie blue染色を行った。

## 4. 画像解析装置による解析

画像解析はImage Processor for Analytical Pathology (IPAP-WIN; 住化テクノサービス, 大阪)を用いて行った。IPAP-WINは各種病理標本やマクロ検体からの画像入力、画像処理と計測が可能であり、画像をすべてデジタ

表1. GPC-MALLS法の条件

カラム	: Shodex SB-806HQ (300mm $\times$ 8.0mm I.D.) $\times$ 1本
移動相	: 0.2M NaNO <sub>3</sub> (0.02%アジ化ナトリウムを含む)
流速	: 0.3mL/min
カラム温度	: 40 $^{\circ}$ C
検出器	: 多角度光散乱検出器 DSP-F (Wyatt Technology社製) RI検出器 RI-71 (昭和電工社製)

ル画像として扱い、光の3原色R(red), G(green), B(blue)によって合成されるカラー画像として捉える<sup>16)</sup>。各症例とも照明のむらを取り除くシェーディング補正を行い、zymography後のalcian blue染色においてback groundとなる領域(サンプルを流していない部分)の吸光度のうちB成分(OD back ground)を測定し、hyaluronidaseによって基質が分解され染色性が低下して白く抜けた領域をHA分解領域(OD hyaluronidase)として検出した。検出されたHA分解領域及びback groundにおける吸光度(R, G, B成分のうちB成分)の差とback groundとの比を以下の計算式により算出し、その症例のOD比(hyaluronidase活性)とした。OD ratio = (OD back ground - OD hyaluronidase) / (OD back ground)

5. *in situ* hybridization (ISH)

1) オリゴプローブの作成ISHに用いたプローブはHyal-1, 2, 3 それぞれの特異的な部位について50merのアンチセンス鎖の合成オリゴヌクレオチドを作成し、3'-Digoxigenin tailing kit (Roche社, Mannheim, Germany)を用いて3'末端にdigoxigeninを標識して用いた。それぞれのプローブの配列は以下の通りである。

なお、陰性コントロールとしては同部位のセンス鎖を作成し、同様な標識をしたものを

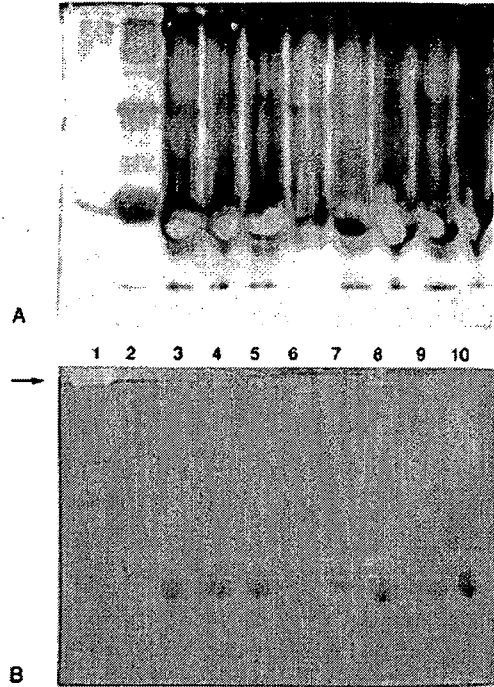


図1. ヒアルロン酸添加ゲルを用いたnative-PAGEによるzymography

A: Coomassie染色

Coomassie染色による蛋白泳動パターンの確認

B: Alcian blue染色

ヒアルロン酸はAlcian blue染色で青色に染色されるため, hyaluronidaseによって分解された基質は染色されず, 白色のバンド(青矢印)として観察できる。

Lane 1: bovine testis, 2: ヒト血清, 3~10: ヒト関節液

用いた。

Hyal-1:

5' AGG CGT GAG CTG GAT GGA GAA ACT GGC  
AGG GTT AAG GAG GAG GAG GGC TT 3'

Hyal-2:

5' AGG TAA TCT TTG AGG TAC TGG CAG GTC  
TCC GTG CTT GTG GTG TAC CCC GC 3'

Hyal-3:

5' GTT GAC TGT AAA CTG AAT AGA GCA AGA  
GTG GGA CAG AGT AGT TCC AGG AC 3'

2) *in situ* hybridization

ISH は MicroProbe Staining System™

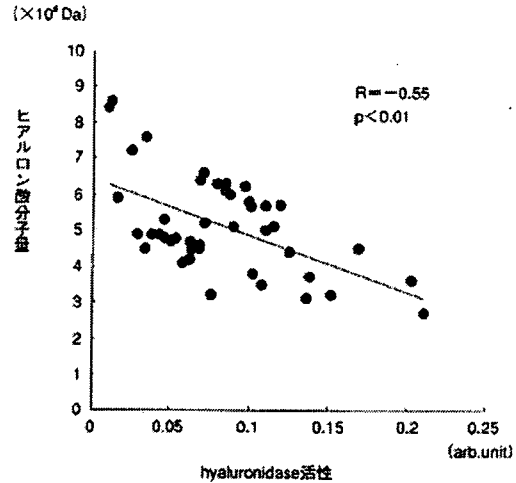


図2. 関節液中のヒアルロン酸分子量とhyaluronidase活性との相関(46例)  
hyaluronidase活性の高い症例では関節液中のヒアルロン酸分子量は低下している傾向が見られる [R = -0.55 (p < 0.01)].

(Fischer社, Pittsburgh, USA) を用いておこなった。方法はUzukiらによって報告されている通りであるが, 毛細管現象を用いたシステムである<sup>17)</sup>。組織切片は2  $\mu$ mに薄切し, Probe On Plusスライド (Fischer社, Pittsburgh, USA) に載せて十分に乾燥させたものを用いた。切片は, 脱パラフィン後にalcoholで親水化され, tris buffer (pH 7.4, Fischer社, Pittsburgh, USA) で洗浄後に, pepsin (2.5mg/ml; Fischer社, Pittsburgh, USA) で105℃, 3分間の蛋白消化反応をおこなった。次に, formamideを含まない液で希釈された合成オリゴプローブを切片上に反応させた。反応温度と時間は105℃で3分間の反応ののち, 45℃で2時間のhybridizationをおこなった。hybridization後は2  $\times$  SSCで室温で1分間, 洗浄したのち, alkaline phosphatase標識の抗digoxigenin抗体を50℃で10分間反応させ, 洗浄後にfast redで45℃で15分間の発色反応を行ない, methyl greenで核染色をおこなった。

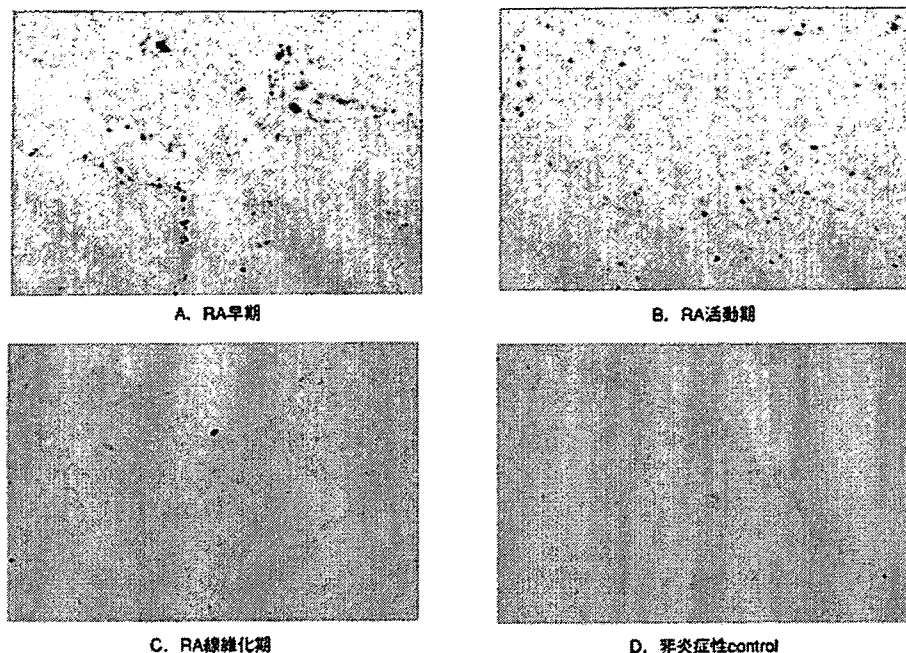


図3. 滑膜組織におけるHyal-1のmRNA陽性細胞の発現  
 早期 (A) および活動期 (B) のRAでは多層化した滑膜表層細胞で高度な陽性反応が見られる (赤紫色) が、線維化期 (C)、非炎症性コントロール (D) ではほとんど陽性反応は見られない (original magnification  $\times 400$ ).

## 6. 統計学的検討

統計学的検討は対応する2変数間についてPearsonの相関指数を用いて、その相関の有無を検定した。有意水準は $p < 0.05$ 未満とした。

## III. 結 果

### 1. 関節液中のhyaluronidase活性の定量化

HA添加ゲルによるzymographyの結果を図1に示す。HAはAlcian blue染色で青色に染色されるため、検体中のhyaluronidaseによって分解された基質は染色されず、バンド (矢印) として観察することができる。白く抜けたバンドの吸光度を画像解析装置IPAPで解析し酵素活性として半定量化することができた。RA46症例の関節液

ではhyaluronidaseの酵素活性はいずれも症例毎に異なっていた。半定量化したhyaluronidase活性値と同一患者の関節液中のHA分子量との相関を示す (図2)。RA患者でhyaluronidase活性の高い症例では関節液中のHA分子量が低下している傾向がみられた [ $R = -0.55$  ( $p < 0.01$ )].

### 2. 滑膜組織でのHyal-1, 2, 3のmRNAの分布 (図3)

Hyal-1のmRNAシグナルは、おもにRA早期 (図3A) や炎症の高度な時期 (図3B) の多層化した滑膜表層細胞で高度な陽性反応がみられ、滑膜の多層化のみられない線維化した症例 (図3C) や非炎症性control (図3D) では陽性細胞数はほとんど認められなかった。Hyal-2, 3についてもほぼ同様な結果が得られた。なお、センスプローブの場合は

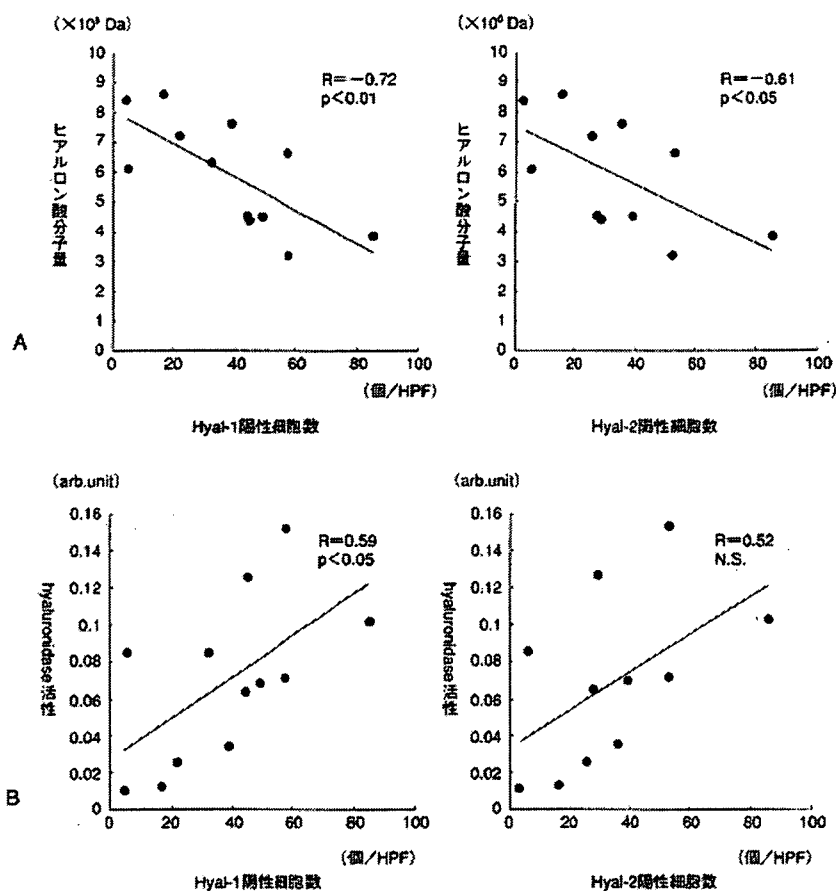


図4. 同一症例 (12例) における関節液, 滑膜組織でのhyaluronidaseの発現の検討  
 A: 関節液中のヒアルロン酸分子量と滑膜中のhyaluronidase陽性細胞数との相関  
 Hyal-1, 2ともに滑膜組織中の陽性細胞数が多い症例ほど関節液中のヒアルロン酸分子量が低下している [Hyal-1:  $R = -0.72$  ( $p < 0.01$ ), Hyal-2:  $R = -0.61$  ( $p < 0.05$ )].  
 B: 関節液中のhyaluronidase活性と滑膜中のhyaluronidase陽性細胞数との相関  
 Hyal-1, 2ともに滑膜組織中の陽性細胞数が多い症例ほど関節液中のhyaluronidase活性が高値を示す [Hyal-1:  $R = 0.59$  ( $p < 0.05$ ), Hyal-2:  $R = 0.52$  (N.S. not significant)].

表2. RA滑膜組織の炎症stage分類による滑膜組織におけるHyal-1, 2のmRNA陽性細胞の発現数の比較 (個/HPF)

	Hyal-1	Hyal-2
非炎症性control (n=3)	0.02	0.05
RA早期 (n=2)	37.6	36.1
RA活動期 (n=9)	46.1	45.7
RA線維化期 (n=6)	8.0	8.2

・Hyal-1,2ともに陽性細胞数はRA早期, RA活動期で高値を示す。

陰性であった。

Hyal-1, 2について強拡大 (400倍) で20視野を無作為に選び, 陽性細胞数を定量化し, 平均を比較してみると表に示す結果となった (表2)。非炎症性controlやRA線維化期の例では陽性細胞数は陰性あるいはごく少数だったのに対し, RA早期, 活動期例では多数の陽性細胞の発現が認められ, 活動期のRA滑膜では酵素の産生が亢進していることが確認された。