

(I) 病理·病態学的研究

関節リウマチにおける関節炎の破壊に関する最近の病理学的话题

澤井 高志^{*1)} 宇月 美和^{*2)}

関節リウマチ (rheumatoid arthritis : RA) による関節の破壊については、病理組織像が従来に比べて大きく変化しているわけではなく、滑膜炎で始まり、軟骨の破壊を経て骨吸収に至り、最終的には関節の変形をきたすという組織像は変わっていない。これら炎症と骨吸収に関する新しい因子や機能が発見されると、病態についての解釈が変化すると同時に、それらの因子が最近の治療によって大きな影響を受け、関節の破壊像が変ってきているのではないかと注目されることになる。一方、それらのタンパクに関連した遺伝子の機能も次第に明らかにされつつあり、ノックアウトやトランスジェニックなどの手法によって遺伝子学的、細胞内でのタンパクの役割に関する解明が行われている。現在、関節破壊の過程がすべて明らかにされたわけではないが、今回は、その過程を追いながら数多くの症例の経験からその形態学的特徴を述べてみたい。

Rheumatoid arthritis in the context of bone and cartilage.

Recent topics of histopathology associated with joint destruction in rheumatoid arthritis.

Division of Leading Pathophysiology, Department of Pathology, School of Medicine, Iwate Medical University.

Takashi Sawai, Miwa Uzuki

Histopathological features of rheumatoid arthritis, beginning from synovitis through deteriorating cartilage and bone to joint destruction has basically unchanged since the old days. On the other hand many inflammatory factors initiating, sustaining and/or activating inflammation such as cytokines and proteolytic enzymes, were successively detected, and followed by genetic analysis using animal models such as transgenic and knockout methods. Newly developed therapies by biological products remarkably have influenced the inflammatory these factors and genes, and seemed to modify the histopathological features.

This article refers the histopathological features of RA in topics such as places involved in early stage, and the cellular origin, especially about the fibroblast like cells (FLS) which have been paid attention recently

*岩手医科大学医学部病理学講座先進機能病理学分野 ¹⁾教授 (さわい・たかし) ²⁾講師 (うづき・みわ)

as key cells presenting immunological, histiocytic and fibroblastic properties, furthermore, participating the bone destruction in part as well as osteoclast in RA.

We also introduce the several animal models of RA applied by many researchers for therapeutic and genetic analyses in RA.

はじめに

関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA) は、全身の関節をおかす慢性炎症性疾患であり、原因は免疫異常によるとされている (図1)。

最近の RA の動向をみた場合、大きく二つの特徴があげられる。一つは生物学的製剤の開発・投与によって、病像が大きく変わりつつあることであり、当然、その変化は滑膜組織の炎症や軟骨・骨の吸収像の変化にも微妙な影響を与えている。もう一つは画像診断の進歩である。小さな病変の観察が可能となり、きわめて早期の変化が捉えられるようになった。こういうなかで、病理学的所見の果たす役割は、正確な細胞・組織学としての裏付けと動態に関する考察ではないかと思われる。それだけに、ヒトの検体を用いた解析の限界

に対しては、動物モデルを用いざるを得ないこともある。ここでは、筆者らが用いてきたいくつかの動物モデルをとりあげながら、最近の RA の話題をとりあげてみた。

RA の初期変化は骨髄に始まる

RA が、最初にどこから始まるかという点については長年の課題であった。最近では骨髄で最初に変化がみられるという説が強いが、それがどのような変化であるかという説が定着したわけではない。越智らは大きな胞体を有する顆粒球系細胞が RA 患者の骨髄内、それも骨破壊の高度な関節の近くに数多くみられ、小さな隙間を通過して滑膜に至るといふ所見を述べている²⁾。RA の滑膜組織においては HLA/DR^+ 、 $CD14^+$ の線維芽細胞様細

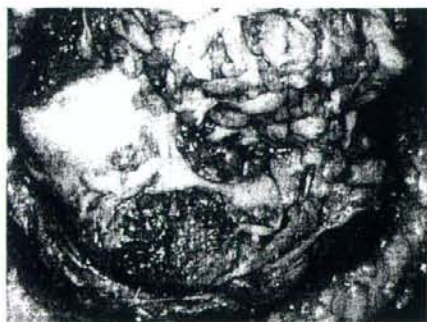


図1 RAの膝関節

RA ではバンヌスの増生が認められ、軟骨、骨を侵食している。

(文献1より引用)



図2 関節滑膜の初期の電顕像

初期には血管周囲に紡錘形の線維芽細胞様細胞 (FLS) が出現してくる。この細胞は RA の病変を形成する主要な細胞であると思われる。

(筆者ら提供)

FLC: 線維芽細胞様細胞, RA: rheumatoid arthritis (関節リウマチ)

胞 (FLC) の増加がみられるが (図2), 骨髄細胞からこの FLC への変換については解明すべき点が多い。問題は, 骨髄で初めに増える細胞は如何なる性質を有する細胞で, 滑膜にどのような形で移動し, 細胞の機能, マーカーをどのように変化, 獲得していくかということである。Li と Makarov は, FLS は間葉系細胞の幹細胞であり, NF- κ B がこの FLS を osteogenic cell や adipogenic cell への分化を調節しているという証明を GFP マウスの培養細胞を用いておこなっている¹²⁾。最近, MRI (magnetic resonance imaging) などで骨髄浮腫と診断される例があり¹³⁾, 抗 CCP 抗体の高値とともに, 予後に関係しそうだと報告されている¹⁴⁾, これも浮腫だけでなく, ある種の細胞が増加していることも十分考えられる。

滑膜の初期病変は bare area から始まる?

ヒトでの滑膜での初期病変は滑膜と軟骨の移行部である bare area から始まるといわれてきた。しかし, ヒトで早期 RA の滑膜を入手することは倫理上からもますます難しくなっており, ま



図3 RA 初期の組織像

滑膜の表層や深部には軽度の CD14, HLA/DR 陽性の細胞を認める。B リンパ球の浸潤は時間的に遅くなる。

(文献6より引用改変)

して, bare area の組織所見をみることは, ほとんど不可能である。RA 発症1カ月例の滑膜組織では, 滑膜表層細胞の増加傾向がみられ (図3), その下の毛細血管の周囲には, HLA/DR 陽性の FLC が出現し, 次に T リンパ球の浸潤, 集簇がみられ, B リンパ球はかなり時間を経てから出現して集簇するのが特徴であった。従って, FLS は初期の状態から RA の病変形成・進行の大きな鍵を握っている可能性があるといえる¹⁵⁾。しかし, 滑膜, 軟骨移行部の bare area がどのようになっているかをヒトで観察するのは不可能であり, 今後, ますます状況は厳しくなるものと思われる。そこで, このような解析には, 動物モデルが必要となってくる。

関節炎の初期病変を観察するために, 自己免疫現象を緩徐に自然発症する MRL/Mp-lpr/lpr (MRL/l) マウスを選択し, 免疫組織学的検討を行った。その結果, 生後4週 of 早期に bare area に近い軟骨下骨髄に炎症性細胞が集積し始め, 週

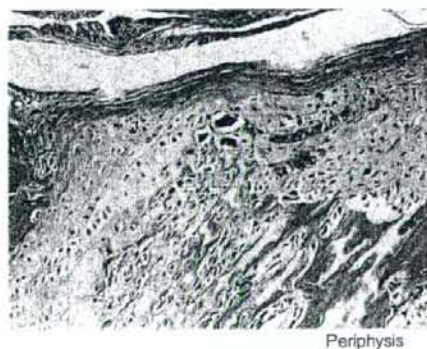


図4 MRL マウスの初期病変

マウスにおいては軟骨, 滑膜, 骨の移行部の periphysis には, IgG の沈着やマクロファージの浸潤を認める。ヒトの bare area に相当するものと思われる。

(文献7より引用改変)

MRI : magnetic resonance imaging

齢とともに、成長軟骨、骨髄に向かって次第に拡大する傾向が認められた⁷⁾ (図4)。さらに、この部位の血管の周囲のIgGや補体の沈着、Mac-1陽性で未消化の貪食物 (dense body) を有するマクロファージ、酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ

(TRAP) 陽性の多核大型細胞が認められ、これらの細胞も週齢とともに増加した。なお、コントロールに用いた DBA/1J マウスでは、同部の炎症性変化は全く観察されなかった。この領域は、Oestreich らにより periphysis と名づけられて

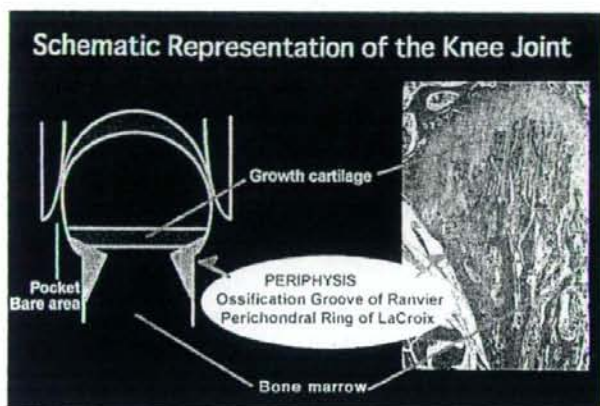


図5 Periphysisの部分のシェーマとマウスの病変

Periphysisの部分は移行部のため柔らかい結合組織と血管が認められる。

(文献7, 8より引用改変)

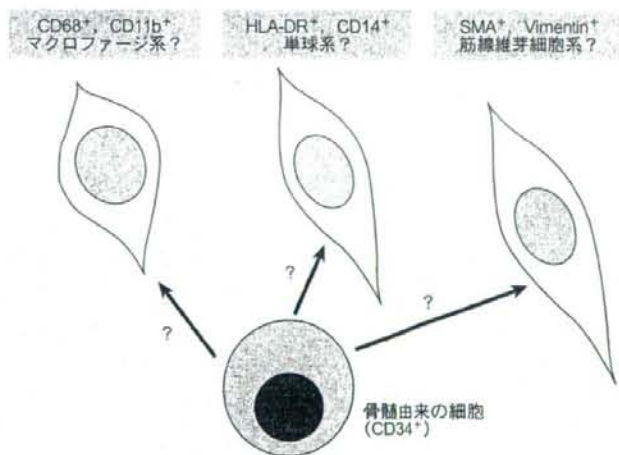


図6 線維芽細胞様細胞 (FLS) の性質

現在、FLSには①本来の線維芽細胞、②免疫担当細胞、③マクロファージ的細胞の3種類が考えられる。これらは主に形と免疫染色をもとに考えられているが、同一の起源を有する細胞かどうかは不明である。

(文献1より引用改変)

TRAP：酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ

おり⁶¹ (図5)、数種の未分化な細胞の存在する ossification groove of Ranvier とⅡ型コラーゲンがネットワークを形成する perichondral ring of Lacroix とから構成される。MRL/l マウスの perichondral ring における変化は、Ⅱ型コラーゲンに対する免疫反応に引き続く軟骨破壊に関連したものと考えられるが、その根拠は、① periphysis の細胞はマウス血清中の抗Ⅱ型コラーゲン抗体と同時期に出現し、炎症性変化は抗体価と相関して変動したこと⁷¹、② 発生の早期から無血管性組織として血液とは隔離されていた軟骨が、組織移行部での血管が侵入する periphysis で新たに抗原として認識されることなどである。従って、モデル動物である MRL/l マウスの periphysis の変化は、ヒト RA における初期病変と共通した所見を呈することが示唆される。

滑膜組織の細胞はどこから

旺盛な炎症を示す RA の滑膜組織をみるとリンパ球、血管に混じって多くの FLS が認められ、この FLS は RA の滑膜炎を特徴づける重要な細胞であろうと思われるが、今のところ、この FLS に

はいくつかの種類があると考えられる。一つは通常の線維芽細胞 (間葉系細胞としての役割) であり、二つには情報伝達に関与する細胞であり (免疫系担当細胞)、そして、三つには骨破壊に関与する細胞 (マクロファージ系細胞) である (図6)。従来、RA は T リンパ球が主体の疾患で T Cell Disease ともいわれてきた。しかし、最近では細胞動態や治療との関係から B Cell が RA の病態の形成に大きな比重を置いているのではないかとされている^{91,10}。以前、NK 細胞の研究が盛んだったころは、滑膜組織に NK 細胞がほとんどいないにもかかわらず、RA は NK 細胞によって支配されているという説が流れたことがあった。形態学的に RA の組織像が時代とともに大きく変化することはないが、さまざまな因子の関与が証明されるにつれて考え方が左右されることは珍しくない。従って、我々形態学に従事しているものの責任は、きちんと物を見て正確に記録しておくことであると思っている。

軟骨・骨破壊への過程とその因子

軟骨・骨の破壊は病理学的にみていくつかの原

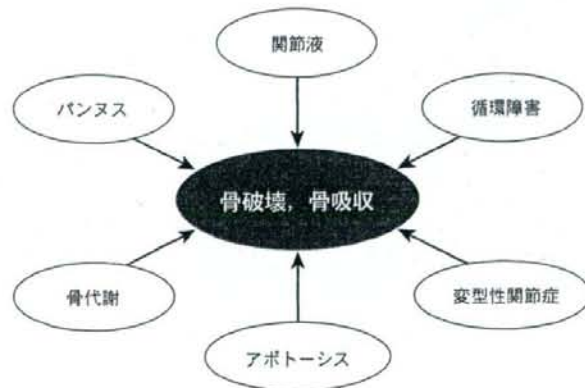


図7 軟骨・骨破壊に影響を与える因子

軟骨、骨の吸収、破壊にはいくつかの原因が考えられる。

(筆者ら作成)

因からなる。関節の破壊となる因子を図7にあげた。もちろん、このなかで破壊的な作用として持続的なもの、あるいは破壊に対して比重の大きなものなど因子によって異なるが、やはり、大きな影響を与えるのは炎症性肉芽組織(パンヌス)では



図8 RAのパンヌス

炎症性の肉芽組織であるパンヌスは腫瘍と同じように浸潤しながら軟骨、骨を破壊していく。

(文献1より引用)

ないかと思われる(図8)。このパンヌスには多くの炎症性細胞や毛細血管と、またそれぞれの細胞が産生、放出するサイトカインやタンパク分解酵素、増殖因子などが含まれている。そして、最近の生物学的製剤による治療との関係で示唆されるのはNF- α の影響が大きいという可能性であろう¹¹⁾。TNF- α を抑えることで炎症が抑制され、手術件数が減少しているという最近の傾向を考えると、この効果をだれしめが目で確認したくなるのではないかと思う。そして、最近抗CD20抗体¹²⁾、抗IL-6 receptor抗体¹³⁾などに関連した生物学的製剤なども効果が認められることから、我々はここでもう一度原点に戻って、これらのサイトカインによって支配されているRAの炎症というものを直す必要があるのではないかと思われる。

最近の治療による組織像の変化

前述のごとく軟骨・骨の吸収、破壊の像が大き

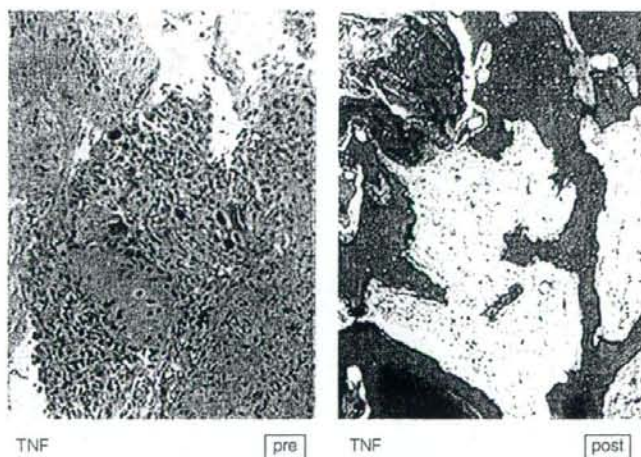


図9 SCIDマウスを利用した生物学的製剤、抗TNF- α 抗体の治療効果の実験

ヒトの滑膜組織(左)をSCIDマウスに移植して抗TNF抗体を投与したところ、炎症性細胞浸潤が消失し(右)、治療効果が動物で実証された。

(筆者ら提供)

く変わったわけではない。ただ、最近生物学的製剤の投与とともにその炎症の特徴に違いが現れてきているような印象を受ける。図9はRA患者の滑膜組織を移植したSCIDマウスに抗TNF- α 抗体を投与した組織像である。写真左のように滑膜組織にみられた炎症性細胞は、写真右のように細胞の種類を問わずほとんど消失してしまってい

る。決して組織が壊死になっているわけではない¹⁾。図10は最近、我々が経験した抗TNF- α 抗体を投与したRA患者の滑膜組織である。マクロファージなどの炎症性細胞はほとんど消失している。図11は炎症反応は治まったものの変形と痛みのために手術をおこなった症例であり、滑膜組織は繊毛性を保ったまま炎症性細胞が減少し、

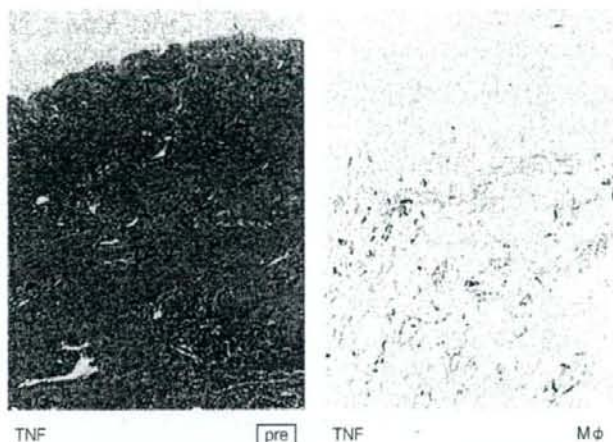


図10 RA患者に抗TNF- α 抗体を投与したあとの滑膜組織

HE染色では、細胞数の減弱が認められ(左)、抗CD68抗体で免疫染色をおこなってもマクロファージはほとんど認められない。

(文献15より引用)



図11 生物学的製剤(抗TNF- α 抗体)を投与したヒトの滑膜組織

図10と同様、炎症性細胞はほとんどみられなくなる(左)、あるいは血管だけが残って、炎症性細胞がなくなる(右)。いずれにせよ炎症性細胞は減少している。

(筆者ら提供)

硝子化あるいは線維化し、毛細血管だけが目立っている。つまり、治療によって滑膜組織の炎症性細胞がなくなってしまうということである。滑膜組織に何が起こったのであろうか。単純に考えれば、炎症性細胞-血管内皮細胞との接着関係が薬剤によって阻害されたとみるべきかもしれない。その機序が接着因子の発現、Rolling、遊走の抑制などによるものかどうか、もっと他の影響があるか等などは今後の課題である。いずれにせよ、これまでみてきた炎症の慢性化による滑膜組織の萎縮とは異なり、絨毛状の形を保ったまま“化石”のように炎症性細胞が消滅してしまったと考えざるをえない。病理学的にみての問題は、滑膜の炎症と軟骨・骨破壊の進行について解離しているものがあるが、その原因については、今後、まだ解析の余地がある。

関節炎と動物モデル

ここで若干、関節炎の動物モデルについて触れる。従来、関節炎モデルは大きく、自然発症と誘発による関節炎に分類され、その後プリスタン、SKJマウスなどの新しいモデル関節炎も追加され、病態の解明や治療の開発に利用されている。表1はこれまで利用されてきた関節炎モデルである。これまでは関節炎のモデルとしては、特にRAを対象にして誘発関節炎と自然発症のモデル動物が用いられてきた。前者は主に治療、後者は病態解明などで利用されることが多い。しかし、最近では遺伝子との関係が注目されるとノックアウト、トランスジェニックを用いた解析が利用されている。また、軟骨、骨破壊についても破壊される側である軟骨、骨などの基質の異常だけでなく、サイトカインやタンパク分解酵素の作用、これに影響を与える因子、さらにアポトーシスなど細胞内のシグナル伝達の面からも解析されている。

表1 関節炎モデル

A. 自然発症関節炎モデル	
1.	MRL マウス関節炎
2.	NZB/KN マウス関節炎
3.	SKJ マウス関節炎
B. 誘発関節炎モデル	
1.	アジュバント関節炎
2.	コラーゲン関節炎ラット
3.	II型コラーゲン関節炎モデルマウス
4.	大腸菌関節炎ウサギ
5.	プリスタン関節炎
6.	レンサ球菌関節炎ラット
7.	塩化水銀関節炎ラット
8.	結晶誘発性関節炎
最近の関節炎モデル	
1.	SCID 細胞移入関節炎
2.	SCID マウス組織移植関節炎
3.	ノックアウトマウスを用いた関節炎モデルの解析
4.	トランスジェニックマウス
5.	カクテル関節炎

(筆者ら作成)

また、抗リウマチ薬が開発されると、その機序、効果については、開発されてきたモデル動物の利用がおこなわれている。動物モデルを用いての利点はその解析に時間の因子や薬剤の投与量、投与方法などを自由に組み込むことができることであり、ヒトでは解析の難しくなってきた初期病変からの組織変化の推移の観察にも有用である。その点では、動物モデルの利用はMRIなどの画像の利用と並んで、今後も関節炎解析の大きな方法である。

しかし、これらのモデル関節炎とヒトの関節炎を比較してみると組織像からみて全く同じように論じていいということではない。むしろ炎症という概括的な表現を除けば異なる面もいろいろみられる。例えば、アジュバント関節炎には顆粒系細胞はみられるもの、リンパ球がみられないし、MRL/l マウスでも滑膜に出ている多くは、リンパ球というよりはマクロファージ系の細胞である。従って、利用する場合はそれらを念頭において使っていく必要がある。ある薬剤をモデル動物に投与して関節炎を抑制したからヒトにも効果があると断定するのは早計であり、慎重な扱いが必要である。以下、我々が扱った関節炎モデルについて簡単に紹介したい。

1. MRL/l マウスの関節炎の解析¹⁶⁾ (図 12)

MRL/l マウスの関節炎の組織像を検討した結果、滑膜組織にはマクロファージ様の細胞が多数出現し、免疫複合体を貪食していた。滑膜の炎症はみられるもののヒトのようなリンパ球の形成をみることはなく、滑膜細胞の多層化もヒトの多層化のような高度なものではなかった。

2. MRL/l マウスの骨髄の変化¹⁷⁾ (図 13a, b)

MRL/l マウスの骨髄の時間による変化をMRL/n マウスとの比較で検討した。その結果、MRL/l マウスでは時間の変化とともにI-A^b、Thy1, 2 陽性細胞が増殖し、これが自己免疫の病態あるいは関節炎に大きく関与している可能性が示唆された。

3. SCID マウスによる抗IL-6 抗体の影響¹⁸⁾ (図 14)

抗TNF- α 抗体投与と類似して、SCID マウスに移植したRA 患者の滑膜の炎症性細胞はほとんど消失する。

MRL/l マウス滑膜のマクロファージ(免疫複合体を貪食した像)

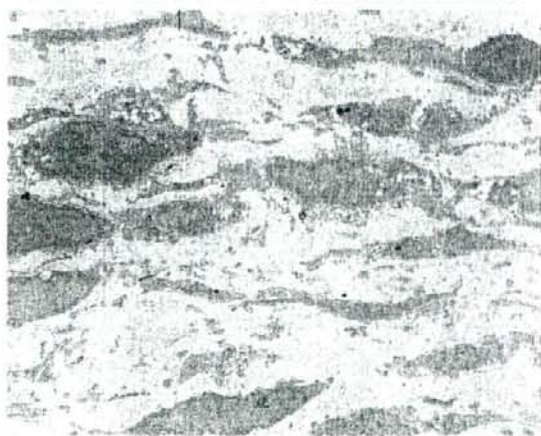


図 12 MRL/l マウスの滑膜組織

MRL/l マウスの滑膜組織には紡錘形の細胞が多数認められ、免疫複合体を貪食している像が認められる。ヒトのRA 滑膜のようなリンパ球の浸潤は目立たない。

(文献 16 より引用改変)

4. アジュバント関節炎¹⁹⁾ (図 15)

Freund Conjugate Adjuvant (FCA) の投与後、24 時間ぐらいで関節には炎症が起こり、初期は顆粒系、後期は単球系が出現してパンヌスを形成する。動物モデルとしてはもっとも激しい関節炎を呈するが、リンパ球よりは顆粒細胞が目立つ炎

症である。

5. プリスタン関節炎²⁰⁾ (図 16)

鉱物油の一成分であるプリスタンを腹腔内投与して関節炎を発症し、軟骨・骨破壊が起こり、炎症性細胞としてリンパ球、形質細胞、多核巨細胞、

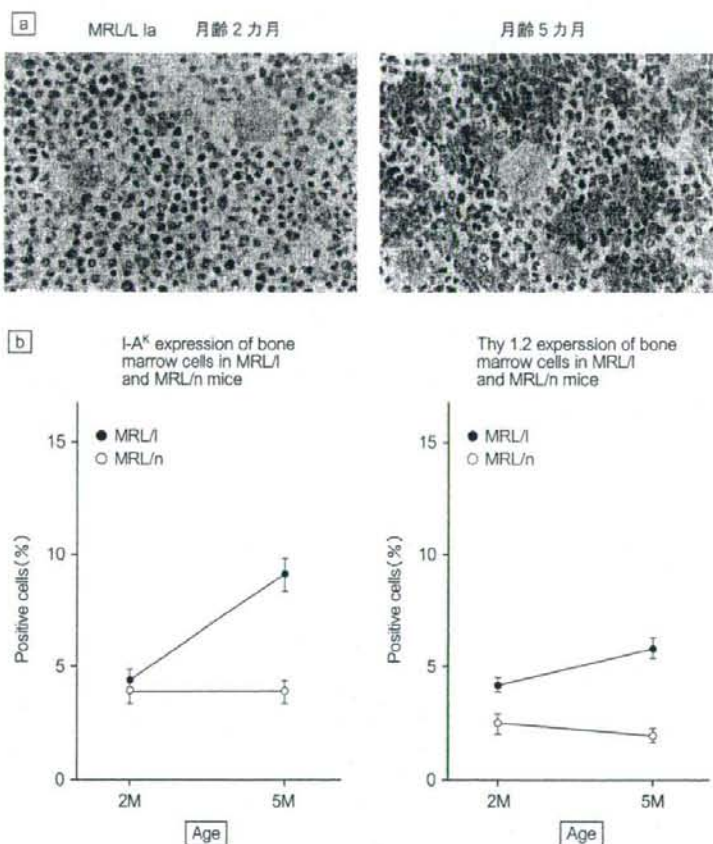


図 13a, b MRL/l マウスの骨髄像の月齢2カ月と5カ月の変化(aは写真, bはグラフ)

I-A*を免疫染色で検討した結果、5カ月例になるとI-A*陽性の細胞が増加する。I-A*はヒトのHLA/DRに相当する。同じ系統で免疫異常を発症しないMRL/nマウスにはこのようなI-A*陽性細胞の増殖は全くみられない。Thy 1, 2についてもI-A*ほど顕著ではないが同じ傾向がみられる。(文献 17 より引用改変)

FCA : Freund Conjugate Adjuvant, GFP : Green fluorescent Protein

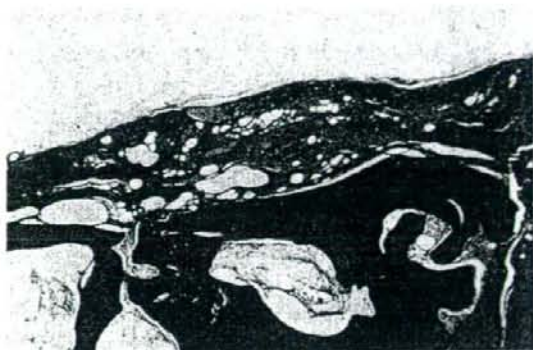


図 14 RA 患者の滑膜組織を SCID マウスに移植して抗 IL-6receptor 抗体を投与したあとの滑膜組織像

滑膜組織では、細胞数の減少が目立つ。

(文献 18 より引用改変)

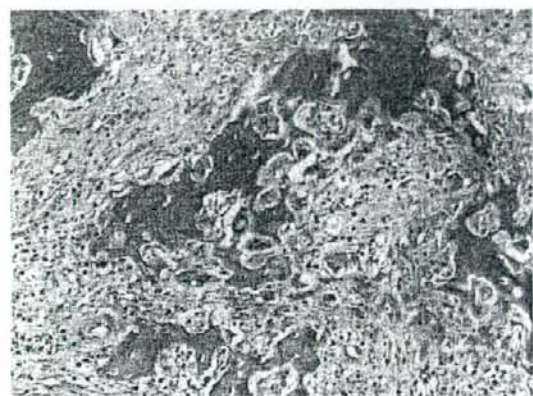


図 15 ウサギで発症させたアジュバント関節炎

顆粒球を主体とする激しい炎症性変化と破骨細胞の活性化により、高度の骨吸収が認められる。抗リウマチ薬の開発のために作成したアジュバント関節炎である。

(文献 19 より引用改変)



図 16 プリスタン関節炎

プリスタン投与によって誘発した関節炎を用いて、接着分子発現の実験を抑制することで抗リウマチ薬の開発中に利用した。プリスタン関節炎は、炎症がアジュバント関節炎に比較し穏やかで、発症までの時間がかかるために経過をみながらの薬剤の投与実験が可能となる。

(文献 20 より引用改変)

組織球の浸潤がみられる。自己抗体も出現し、SLE モデルの解析としても扱われている。

6. Green fluorescent Protein (GFP) による細胞の解析 (図 17)

関節炎における骨髄と滑膜に浸潤する細胞の関

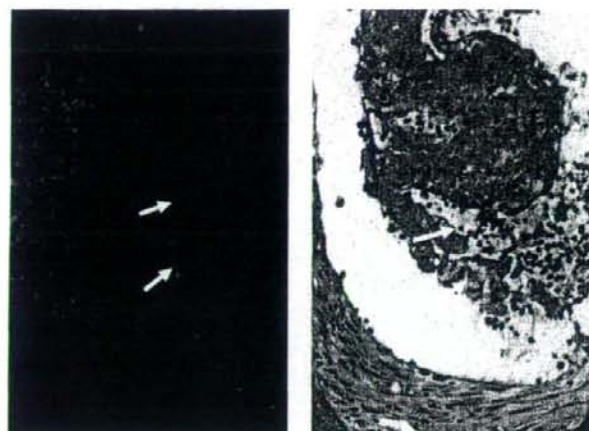


図 17 GFP マウス

放射線で骨髄を空にしたマウスに GFP の細胞を移入し、さらに関節炎の発症を試みた。その結果、骨髄で増殖した GFP 由来の骨髄細胞が関節炎の初期に滑膜に浸潤しているのが認められた。

(筆者ら提供)

連を検討するため GFP マウスを用いて細胞の性質について検討した。その結果、関節炎でみられる滑膜に浸潤する細胞は骨髄由来であることが証明され、現在、滑膜に現れる細胞のマーカー、機能を解析中である。

7. カクテル関節炎

最後に、最近しばしば利用されるカクテル関節炎を紹介したい。これは、コラーゲン関節炎の一種で関節炎の発症の経験のない方でも簡単に扱うことができるが、発症に用いる試薬の値段の少々高いのが難である。Ⅱ型コラーゲンに対する4種類の抗体からなるカクテルで、これを尾静脈あるいは腹腔に注射し、数日後に LPS を腹腔に打つだけで2、3日するとほとんど 100% のマウスに関節炎が発症する。関節では、図 18 のようにヒト RA のパンヌスに類似した像が認められる²¹⁾。

このように、モデル動物では、ヒトでは制約が多く、利用できない部分を扱うことも可能であり、利用のされ方も時代とともに変化してきている。

しかし、培養実験と同様に動物モデルはあくまでもモデルであり、ヒトとは異なることを念頭において用いるべきである。また、最近のように目

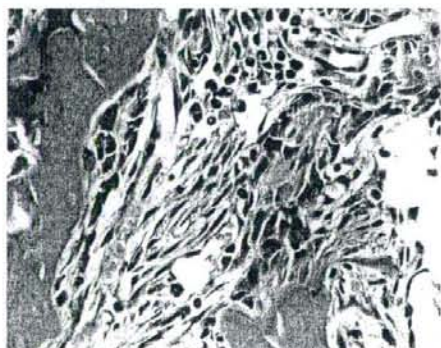


図 18 C57BL/6J マウスで発症したカクテル関節炎 2、3日でヒトのパンヌスに類似した炎症性肉芽組織が形成される。

(筆者ら提供)

覚ましい治療の進歩によってヒトでの病態解析がかなり可能になってくると、動物モデルの利用方法も考えていく必要があるように思われる。

おわりに

最近、話題になっている治療の影響、RA の発現に関与する細胞、特に FLS を中心にとりあげてみた。治療については、これからも新しい薬剤が次々開発されるであろうし、初期病変の解析も動物モデルを用いながら着実に進められている。病

理組織学的解析というのは、一見ふるい前近代的な解析方法と思われるかもしれないが、実は裏を返せばもっとも確実な解析方法といえる。

この稿を終えるにあたり、共同研究者である川中真希、森 士郎、松野博明各先生方に深謝する。

なお、本研究の一部は厚生労働省「免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業」(越智班)の研究助成によるものである。

文 献

- 1) 澤井高志, 宇月美和ほか: 滑膜の炎症から骨破壊まで。関節リウマチ最新医学別冊(宮坂信之編), 最新医学社。大阪, p26-41, 2008.
- 2) Tomita T, Kaneko M, Takano H, et al: Bone marrow plays an important role in joint destruction in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Calcium* 11: 561-567, 2001.
- 3) Li X, Makarov SS: An essential role of NF- κ B in the "tumor-like" phenotype of arthritic synovialocytes. *PNAS* 103: 17432-17437, 2006.
- 4) Kawakami A, Tamai M, Eguchi K, et al: Classification of early arthritis patients and how to determine disease severity. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* 30: 37-40, 2007.
- 5) Mathsson L, Mullaizehi M, Wick MC, et al: Antibodies against citrullinated vimentin in rheumatoid arthritis: higher sensitivity and extended prognostic value concerning future radiographic progression as compared with antibodies against cyclic citrullinated peptides. *Arthritis Rheum* 58: 36-45, 2008.
- 6) 澤井高志, 大山 明ほか: 慢性関節リウマチ滑膜初期病変の免疫組織化学的検討—モノクロー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.
- 7) Tanaka M, Fujii K, Tsuji M, et al: Autoimmune reaction to type II collagen and cartilage degeneration in MRL/Mp-lpr/lpr mouse. *Rheumatol Int* 24: 84-92, 2004.
- 8) Ralphs JR, Benjamin M: The joint capsule—structure, composition, again and disease. *J Anatomy* 184: 503-550, 1994.
- 9) Magalhães R, Stiehl P, Morawietz L, et al: Morphological and molecular pathology of the B cell response in synovitis of rheumatoid arthritis. *Virchows Arch* 441: 415-427, 2002.
- 10) Kondo S, Akashi T, Katsuta H, et al: B cell as key contributors in determining the level of immune responses B cell targeted therapy in patients with autoimmune diseases. *Fukuoka Igaku Zasshi* 96: 86-92, 2005.
- 11) Chu CQ, Field M, Feldmann M, et al: Localization of tumor necrosis factor alpha in synovial tissues and at the cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 34: 1125-1132, 1991.
- 12) Genovese MC, Kaine JL: ACTION Study Group: Ocrelizumab, a humanized anti-CD20 monoclonal antibody, in the treatment of patients with rheumatoid arthritis: A phase I/II randomized, blinded, placebo-controlled, dose-ranging study. *Arthritis Rheum* 58: 2652-2661, 2008.
- 13) Nishimoto N, Yoshizaki K, Miyasaka N, et al: Treatment of rheumatoid arthritis with humanized anti-interleukin-6 receptor antibody: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 50: 1761-1769, 2004.
- 14) Matsuno H, Yudoh K, Katayama R, et al: The role of TNF-alpha in the pathogenesis of inflammation and joint destruction in rheumatoid arthritis (RA): a study using a human RA/SCID mouse chimera. *Rheumatology (Oxford)* 41: 329-337, 2002.
- 15) 澤井高志: 慢性関節リウマチの病態と発生機序現代病理学大系 補巻3 (飯島宗一編)。中山書店, 東京, p165-176, 1996.
- 16) 澤井高志, 京極方久: MRL/l マウス, 難治疾患のモデルと動物実験—ヒト疾患との共通理解のために。京極方久監修。ソフトサイエンス社, 東京, p232-243, 1984.
- 17) 森 士郎, 能勢真人ほか: MRL/Mp-lpr/lpr マウスにおける関節炎の成因と骨髄細胞の関与。臨床

- 免疫 23 : 1428-1435, 1991.
- 18) Matsuno H, Sawai T, Nezuka T, et al : Treatment of rheumatoid synovitis with anti-reshaping human interleukin-6 receptor monoclonal antibody. *Arthritis Rheum* 41 : 2014-2021, 1998.
- 19) 澤井高志, 字月美和ほか : アジュバント関節炎の病理. *分子リウマチ* 1 : 255-260, 2004.
- 20) Satoh M, Reeves WH : Induction of lupus-associated autoantibodies in BALB/c mice by intraperitoneal injection of pristane. *J Exp Med* 180 : 2341-2346, 1994.
- 21) Terato K, Harper DS, Griffiths MM, et al : Collagen-induced arthritis in mice: synergistic effect of *E. coli* lipopolysaccharide bypasses epitope specificity in the induction of arthritis with monoclonal antibodies to type II collagen. *Autoimmunity* 22 : 137-147, 1995.



B5判 392頁
定価 5,145円
(本体 4,900円+税5%)
送料実費
ISBN978-4-7532-2252-0 C3047

錠剤・カプセル剤の 無包装状態での安定性情報 改訂5版

「錠剤・カプセル剤の無包装状態での安定性情報」
編集委員会 編

西岡 豊・大坪健司・木平健治・杉本 功・中川文夫
水口和生・宮村充彦・奥田秀毅・外岡弘道

無包装状態での錠剤・カプセル剤はどこまで安定か ―。

- ◎開封後の医薬品の安定性情報を定期的にまとめて収載。
- ◎大好評の前版より、さらに内容充実の改訂5版。掲載品目3,391。
- ◎製薬会社139社の品目毎試験データによる安定性情報がすぐ引ける。
- ◎高齢化社会等を背景に急激に増えつつある一包化調剤。その現状において何より重要な患者のための品質管理に必携の一冊。

株式会社 医薬ジャーナル社 〒541-0047 大阪市中央区淡路町3丁目1番5号・淡路町ビル21 電話 06(6202)7280(代) FAX 06(6202)5295 (無登録番号)
〒101-0061 東京都千代田区三輪町3丁目3番1号・TKビル 電話 03(3265)7681(代) FAX 03(3265)8369 (00910-1-33353)

骨・軟骨と関節リウマチ

Review

①

RAにおける骨・軟骨破壊の病理学的特徴

宇月美和, 佐々木喜子, 澤井高志 (岩手医科大学医学部病理学講座先進機能病理学分野)

はじめに

関節リウマチ (RA) の組織学的な所見として教科書的によく知られているのは, ①滑膜細胞の増生にともなう絨毛状増生, ②血管の増生, ③リンパ球などの炎症性細胞浸潤, ④軟骨や骨の破壊である。このうち①~③は主に滑膜組織での変化であるが, 程度の差はあれ, 他の関節疾患でもみられる変化である。特に滑膜細胞の多層化は関節炎の最も早期に生じる変化で, 化膿性関節炎のような急性炎症でもみられる。また, 変形性関節症や, 非特異的な慢性滑膜炎でも①~③の変化はみられる。

また, 最近では内科的な治療の発達により, RAにおいても手術時には炎症がそれほど強くない症例も多くみられるようになった。特に tumor necrosis factor (TNF) などを標的にした生物学的製剤の出現以降は, 我々病理医が観察するRAの滑膜組織像も大きく変化してきている。RA患者からの病変として提出されていても, 炎症が弱く瘢痕化組織のみの場合もある。こういった場合, 組織像のみではRAと診断困難なことも多い。

一方, ④の軟骨や骨の破壊については, RAに特徴的な変化とされている。破壊に至るまでには多くの要因が挙げられ, 現在も様々な新たな物質の関与が示されているが, 本稿では基本的な形態学的な内容について示す。

1. 滑膜病変から軟骨・骨破壊に至る変化

RAの関節病変はまず滑膜から始まるとされている。前述の①~③の滑膜病変の生じたのちに軟骨や骨の病変がみられるようになることから, 滑膜病変と軟骨や骨の病変は当然ながら連続しているものと推察される。RAの滑膜で主にみられる細胞はリンパ球などの炎症性細胞であり, 軟骨や骨にみられる

のは破骨細胞や破軟骨細胞であり, 一見, 滑膜病変と骨病変は不連続な変化のようにみえるが, 両者を結びつける特徴的な組織像がRAには認められる。

RAの滑膜が軟骨や骨の破壊部に移行する破壊先進部の組織はバンヌスとよばれているが, この部分の組織像はまさにRAに特徴的である。対照としてよく比較される変形性関節症 (OA) の場合にはこのようなバンヌスは認められず, 滑膜が軟骨や骨を破壊する肉芽組織に変化するようなこともない。この滑膜からバンヌスにかけての組織内にRAに特徴的な細胞がみられる。

2. RAに特徴的な細胞

最近, RAの病変に特徴的な細胞として線維芽細胞様滑膜細胞 (fibroblast like synoviocyte: FLS) が注目されている (図1)。治療によってRAの炎症そのものをコントロールすることができても, 軟骨や骨の破壊の進行を制御できない症例がしばしば認められるが, こういった症例の組織像は典型的なRAの組織像とは異なり, 炎症性細胞よりはむしろ上記の

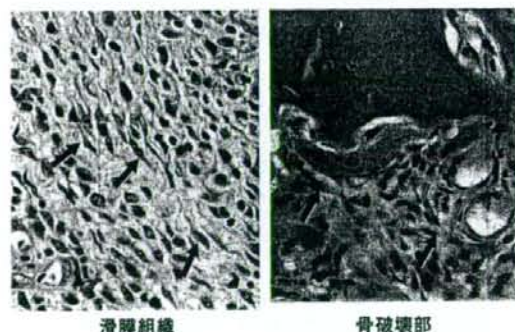


図1 FLSの増殖

滑膜組織 (左), 骨破壊部 (右) とともに FLS (→) が認められる。

FLSが目立つことが多い。また、RAについては生物学的製剤を主として、劇的な効果を示す治療法が確立されつつある。

治療後の組織を観察すると、前述の①滑膜細胞の多層化や②血管増生、③炎症性細胞浸潤はそれぞれ程度が弱くなる。しかし、FLSについては炎症が軽度になった後も残存する。

炎症が治まったRAや発症早期のRAでは他疾患による慢性炎症との鑑別が困難な場合も多いが、このFLSの有無に注目することが重要と思われる。

また、関節炎のモデル動物でも、病変部にはヒトRAと同様にFLSが認められており²⁾、この細胞が関節炎の発症や持続に重要な細胞であると思われる。したがって、この細胞の起源や性格について検討することによって、RAの発症機序や治療について解明に近づける可能性がある。

3. FLSの起源

RAの早期の滑膜組織を観察すると、滑膜組織のsubliningの毛細血管あるいは小静脈周囲にHLA-DR陽性のFLSの浸潤がまず認められる。このFLSの出現はリンパ球などの炎症性細胞浸潤がそれほど目立たず、血清学的にもリウマチ因子が陰性の段階から認められる³⁾。後述するが、FLSは形態学的には線維芽細胞様の特徴をもちながら種々の物質を産生し、多機能であるため、骨髄が起源であるとの意見

が多い。特に、骨髄にあるCD34陽性細胞をNurse Cell由来であるとする意見もあり、それを裏付けるデータも多く報告されている^{4, 5)}。

4. FLSの特徴

FLSは紡錘形で形態学的には線維芽細胞の特徴をもちながら様々な機能をもっている。我々の検討ではFLSはinterleukin (IL)-1やTNF- α などのサイトカインをはじめ、matrix metalloproteinase (MMP)-2やMMP-9などの非ライソゾーム型の蛋白分解酵素であるマトロプロテアーゼ、カテプシンLやカテプシンKなどのシステインプロテアーゼと、多くの蛋白分解酵素を産生する(図2)⁶⁻¹⁴⁾。その他、分解される側の基質であるコラーゲンやプロテオグリカン、ヒアルロン酸などの産生も行っており、多機能、多分化能を示している。この細胞は滑膜病変部にも骨破壊部にも認められ、両者の細胞の起源は同一であることが示唆されているが、いまだに明らかにはされていない。

RA患者の骨髄組織を観察すると、造血細胞の他に間質の細胞が認められる。この細胞の一部がFLSと同様の特性をもつとされる。電子顕微鏡的な特徴を検討すると、この細胞は紡錘形の形態を示しながら、①ライソゾームや突起を豊富にもつマクロファージ様の細胞、②粗面小胞体が発達し、突起の乏しい線維芽細胞様の細胞、③この①と②両方の特徴を

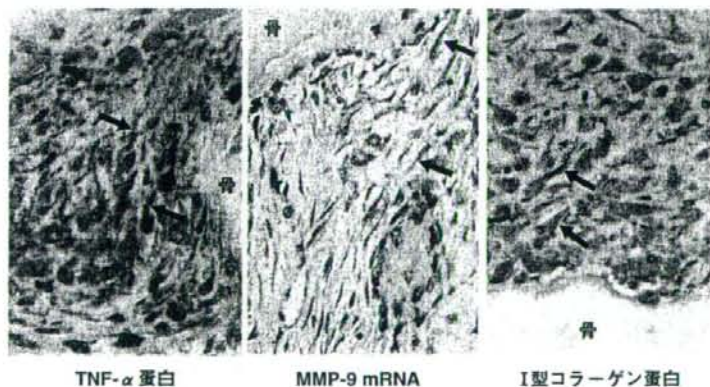


図2 RA骨破壊部のサイトカインや蛋白分解酵素

FLSにおいてはTNF- α やMMP-9、I型コラーゲンなどの多くのサイトカインや蛋白分解酵素、基質蛋白などの陽性所見が認められる。



図3 RA症例の滑膜組織（電子顕微鏡像）

滑膜組織には紡錘形の細胞が認められ、電顕的にはライソゾームや豊富な突起をもつマクロファージ系、粗面小胞体が発達した線維芽細胞系、および両者の特徴をもつ細胞が認められる。

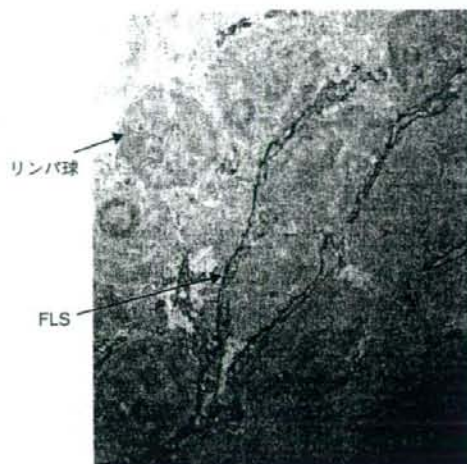
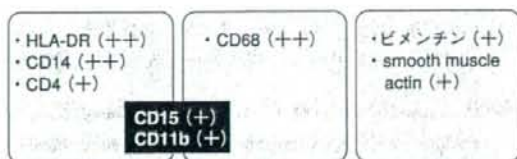


図5 RA症例の滑膜組織でのBST-1免疫関連陽性細胞（リンパ濾胞）

リンパ球などと接している紡錘形細胞が陽性となる。



単球、骨髄由来？ マクロファージ系？ 筋線維芽細胞系？

図4 FLSの特徴

免疫組織化学的なマーカー検索により、FLSは単球・骨髄系、マクロファージ系、筋線維芽細胞系など多彩な機能と分化能をもつ細胞であることが示唆される。

もつ細胞など、多彩な像を示している（図3）。また、免疫組織化学的にも上記の細胞は、①CD11bやCD68陽性のマクロファージ系や、②CD14やHLA-DR陽性の単球系である他に、③smooth muscle actin (SMA) やビメンチン陽性の筋線維芽細胞系の細胞も含まれている。最近の検討ではCD157 (BST-1)、VCAM-1なども陽性となる（図4）¹⁵⁾。これらのマーカーはOAや外傷でも少数の陽性細胞が認められるが、RAのそれに比較して明らかに少数である。RAでは骨髄内のこのFLSが滑膜内でも増殖して滑膜炎やパンヌスの形成に関与すると思われる。

5. FLSと他の細胞との関係

RAの滑膜病変および骨破壊部において目立つのは滑膜ではリンパ球や単球などの炎症性細胞、骨破

壊部では破骨細胞であるが、これらは程度の差はあれRA以外の関節病変にも認められる細胞である。

RAではこれらの細胞の周囲にFLSが目立っており、このFLSがRAに特異的な骨破壊を引き起こす機能を持つのではないと思われる。Nozakiらの報告によれば、CD14陽性の滑膜組織由来の細胞がパンヌスの成長に大きな影響をもたらすとされる¹⁶⁾。

このFLSそのものでも蛋白分解酵素の産生がみられるが、その他にリンパ球などの免疫系の細胞にFLSが接している像も多くみられ、細胞同士で情報交換していることが推察される（図5）。もしそうであれば、様々なサイトカインや蛋白分解酵素と同時にこの細胞の活性を抑制することがRAの治療につながるものと思われる。

まとめ

RAの炎症は免疫異常を基礎とした炎症と非特異的炎症の二つに特徴づけられる。前者を代表する炎症性細胞はリンパ球を中心としたものであり、後者は顆粒球といえるが、後者の肉芽組織が骨吸収につなが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や活性を抑えることが骨吸収の抑制に繋がる可能性がある。以上、病理組織学から

みて軟骨・骨破壊を取り上げてきたが、現在、いまだにはっきりしていないのが滑膜の炎症から軟骨・骨吸収に至る過程である。この点についてはFLSを中心とした詳細な分析が今後の課題といえる。

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。

文献

- 1) 宇月美和, 佐々木喜子, 澤井高志. 関節リウマチにおける軟骨・骨破壊の病理学的特徴. *Clinical Calcium* 2007, 17: 474-483.
- 2) Tanaka M, Fujii K, Tsuji M, et al. Autoimmune reaction to type II collagen and cartilage degeneration in MRL/Mp-lpr/lpr mouse. *Rheumatol Int* 2004, 24: 84-92.
- 3) 澤井高志, 大山 明, 村上一宏, 他. 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* 1990, 30: 247-254.
- 4) Hirohata S, Yanagida T, Nagai T, et al. Induction of fibroblast-like cells from CD34⁺ progenitor cells of the bone marrow in rheumatoid arthritis. *J Leukoc Biol* 2001, 70: 413-421.
- 5) Hirohata S, Miura Y, Tomita T, et al. Enhanced expression of mRNA for nuclear factor κ B1 (p50) in CD34⁺ cells of the bone marrow in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2006, 8: R54.
- 6) Maeda S, Sawai T, Uzuki M, et al. Determination of interstitial collagenase (MMP-1) in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1995, 54: 970-975.
- 7) 伊藤 崇, 宇月美和, 嶋村 正, 澤井高志. 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* 2002, 42: 60-69.
- 8) Seki M, Uzuki M, Ohmoto H, et al. Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) in patients with rheumatoid arthritis. *Jpn J Rheumatol* 1997, 7: 197-209.
- 9) Sawai T, Murakami K, Ohtani Y, et al. Stromelysin synthesizing cells in the synovial tissues of rheumatoid arthritis demonstrated by in situ hybridization and immunohistochemical methods. *Tohoku J Exp Med* 1990, 160: 285-286.
- 10) 斎藤隆幸, 宇月美和, 力丸 陽, 他. RA 患者の血清, 関節液, 関節組織における TNF α の発現. *炎症* 1994, 14: 143-150.
- 11) 澤井高志, 宇月美和, 高橋裕一, 吉村浩一. 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* 1992, 10: 1033-1040.
- 12) 深町知博, 宇月美和, 田村裕昭, 他. 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* 1994, 14: 489-497.
- 13) 宗像孝佳, 宇月美和, 嶋村 正, 他. 慢性関節リウマチにおける Interleukin (IL)-18 の発現. *リウマチ* 2001, 41: 625-634.
- 14) Yoshimura F, Kanno H, Uzuki M, et al. Downregulation of inhibitor of apoptosis proteins in apoptotic human chondrocytes treated with tumor necrosis factor-alpha and actinomycin D. *Osteoarthritis Cartilage* 2006, 14: 435-441.
- 15) 澤井高志, 宇月美和, 佐々木喜子, 金 仁順. 病理—滑膜の炎症から骨破壊まで—. *最新医学・別冊 新しい診断と治療の ABC* 2008, 8: 26-43.
- 16) Nozaki T, Takahashi K, Ishii O, et al. Development of an ex vivo cellular model of rheumatoid arthritis: critical role of CD14-positive monocyte/macrophages in the development of pannus tissue. *Arthritis Rheum* 2007, 56: 2875-2885.

1. 免疫染色・*in situ* hybridization

宇月美和、澤井高志

岩手医科大学 病理学第一講座

はじめに

最近では様々な種類の物質に対する抗体の作成が可能になり、免疫組織化学の方法も増感法や賦活化など、感度をあげるために様々な工夫がなされている。そのため、従来はパラフィンブロックでは染色困難とされてきたリンパ球表面マーカーや接着分子の同定も容易になってきた。また、試薬調整の必要ない簡便なキットも市販され、マニュアルに従えば、ある程度の結果は期待できるようになった。こういった免疫組織化学法や *in situ* hybridization (ISH) 法の進歩の中で、エラスチンなどの弾性線維をはじめとする基質成分では他のマトリックスとの関連や研究者人口が多くないこともあり、応用できる抗体やプローブの種類はいまだに多くはない。本稿では弾性線維を中心として検体の取り扱いや免疫組織化学および ISH について述べる。

1. 検体の取扱いと染色

1) 採取・切り出し

ヒトの検体の場合は、手術症例や剖検例からの採取となるが、採取後できるだけ早く切出し、固定することが重要である。動物実験の場合には還流固定などが用いられるため、細胞や組織の変性はほとんど生じないが、ヒトの検体の場合には手術例にせよ、剖検例にせよ、血流が途絶えた状態が短ければ短いほど望ましい。大きな検体の場合には、固定液が浸透しやすいように小さくトリミングすれば、その後の脱脂なども短時間に終了できる。また、固定の際には組織に収縮が起きるが、この収縮率は組織の構成成分によって異なり、固定後に検体がゆがんでしまうため、切り出す際の注意が必要である。特に、膠原線