

## 関節リウマチ滑膜における Bv8 の発現

及川伸也<sup>1), 2)</sup>, 鎌滝章央<sup>1)</sup>, 三又義訓<sup>1), 2)</sup>,  
村上賢也<sup>1), 2)</sup>, 澤井高志<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 岩手医科大学医学部, 病理学講座: 先進機能病理学分野

<sup>2)</sup> 岩手医科大学医学部, 整形外科科学講座

(Received on January 13, 2010 & Accepted on January 26, 2010)

### 要旨

関節リウマチ (rheumatoid arthritis; RA) は破壊性関節炎を主体とした炎症性疾患である。RA の病理学的特徴のひとつに血管新生が挙げられ、その病態形成に重要な役割を担っている。Bv8/Prokineticin 2 は多様な生理活性を持つタンパクであり血管新生因子としても機能する。本研究では、1) *in situ* hybridization や免疫組織化学染色で RA 滑膜組織における Bv8 の発現と局在を調べ、2) real-time PCR

で RA, 変形性膝関節症 (osteoarthritis; OA), 膝外傷後滑膜における Bv8 の mRNA 発現量を比較した。Bv8 は滑膜の sublining layer や深層に発現しており、発現細胞は細胞学的には多彩であった。また、Bv8 の発現量は RA 群で OA 群や外傷後群と比較して有意に高かった。これらの結果より、Bv8 が RA の病態に関与している可能性が示された。

Key words : Bv8, prokineticin, angiogenesis, rheumatoid arthritis

### I. 結 言

関節リウマチ (rheumatoid arthritis; RA) は破壊性関節炎を主体とした炎症性疾患で、関節破壊によって関節機能が障害される疾患である。関節炎の本態は滑膜炎で、背景には自己免疫異常が関与していると言われている。病理学的には、滑膜細胞の多層化、炎症性細胞浸潤、軟骨・骨破壊、血管新生等の特徴がある。多層化した滑膜細胞やマクロファージ、T 細胞、B 細胞等の炎症性細胞により形成された増殖滑膜はパンヌスと呼ばれ、破骨細胞の活性化や蛋白分解酵素の分泌により軟骨・骨破壊を引き起こす。新生血管はパンヌスへの酸素や栄養分の供給路、炎症性細胞や炎症性サイトカインなどの到達路となることで、炎症を継続させパンヌスの増殖を支えている。RA 滑膜では VEGF, FGF, TGF- $\beta$ , アンジオポエチンなど様々な血管

新生因子が高く発現しており<sup>1-4)</sup>、RA の病態に関わっていることが知られている。さらに、関節炎モデルマウスを使った実験で新生血管の増生が関節炎の増悪と相関する<sup>5, 6)</sup>ことや、血管新生の阻害は炎症反応を減弱するだけでなく軟骨・骨破壊も抑制する<sup>7)</sup>ということも明らかにされている。以上のように、血管新生は RA の病態形成に極めて重要な役割を担っている<sup>1, 8)</sup>。そのため、RA における血管新生の機序を解明することは新しい治療開発のきっかけとなる可能性がある。

Bv8 は *Bombina variegata* というカエルの皮膚からの分泌物から分離された 8kDa のタンパクで、2001 年にヒトのホモログがクローニングされ、Prokineticin 2 と名付けられた。ヒトの Bv8 は心臓や精巣、骨髄、リンパ組織、白血球などで高く発現している<sup>9)</sup>。生理活性としては最初にモルモットの小腸を

Table 1. Clinical information of RA patients

Subjects	Age/Gender	Disease duration (year)	Medications	CRP (mg/dl)
RA-1	60/F	no data	no data	no data
RA-2	67/F	22	none	no data
RA-3	56/F	11	no data	4.5
RA-4	51/F	18	MTX	5.1
RA-5	55/M	40	none	1.1
RA-6	77/F	25	MTX	0.3
RA-7R	46/F	9	PLS	4.1
RA-7L	46/F	9	PLS	1.5
RA-8	55/M	no data	BUC, PLS	0.1
RA-9	70/M	20	D-PC, PLS	5.9
RA-10	57/M	6	SASP	0.7
RA-11	76/F	20	MTX, PLS	1.3
RA-12	63/F	15	MTX, PLS	0.5
RA-13	80/F	no data	BUC	0.6
RA-14	71/F	10	ETN, SASP, PLS	0.7
RA-15	62/F	23	BUC, PLS	0.1
RA-16	69/F	23	PLS	7.4
RA-17	79/F	28	MTX, PLS	5.5

MTX; methotrexate, PLS; prednisolone, BUC; bucillamine, D-PC; D-penicillamine, SASP; salazosulapyridine, ETN; etanercept

収縮させる機能が報告され, その後, 神経新生, サーカディアンリズムの調節, ホルモン放出, 血管新生などにも働くことが明らかにされている<sup>9)</sup>. 血管新生に関しては, 腫瘍の発達の際に Bv8 が腫瘍局所での血管新生を促進させる<sup>10)</sup>ことや, 腫瘍形成の早期の段階で Bv8 が血管新生を誘導する<sup>11)</sup>ことが報告されている.

Bv8 と関節炎に関わる研究として, 関節炎モデルマウスの滑膜と骨髄に Bv8 が高く発現している<sup>12)</sup>という報告はあるものの, ヒトの RA と Bv8 との関連を示した報告はまだない. 本研究では RA 滑膜における Bv8 の発現と局在を解析することで, RA と Bv8 との関連を検討した.

## II. 材料および方法

### 1. 対象

本研究は岩手医科大学倫理委員会の承認と患者の同意を得て採取した検体を使用し

た. 対象は RA (18 例: 年齢 46 ~ 80 歳, 平均 60.7 歳, 男性 4 例, 女性 14 例), 変形性膝関節症 (osteoarthritis; OA) (13 例: 年齢 72 ~ 84 歳, 平均 70.7 歳, 男性 1 例, 女性 12 例), 膝外傷後 (9 例: 年齢 14 ~ 52 歳, 平均 28.5 歳, 男性 5 例, 女性 4 例) 患者膝滑膜で, RA, OA 滑膜は人工膝関節全置換術, 膝外傷後滑膜は関節鏡視下手術の際に採取した. RA 滑膜は肉眼的に炎症の強い部分を採取した. RA 患者の罹病期間や臨床データは Table 1 に示す. RA 患者はすべてアメリカリウマチ学会の 1987 年改訂分類基準を満たしていた. OA 患者は Kellgren-Lawrence 分類 Grade III と IV であった. 膝外傷後患者は半月板損傷や, 前十字靭帯損傷により手術になった症例で, 受傷から手術までの期間は 2 ~ 12 ヶ月 (平均 4.8 ヶ月) であった. 手術時, 膝外傷後患者に関節水症等の関節炎を疑う所見は認められなかった. *in situ* hybridization 用, 免疫組織化学染色用の滑

膜組織は4%PFA/PBSで固定した後、パラフィン包埋し、4℃で保存した。RNA解析用の滑膜組織は採取直後にドライアイスで凍結し、RNA抽出時まで-80℃で保存した。

## 2. 方法

### 1) プロープ作製

プロープを作製するために、まずHL-60由来のcDNAを鋳型に用いBv8 DNA断片をPCRで増幅した。プライマーとしては以下の塩基配列のものを使用した。Forward; 5'-CGGGATCCTTGTGACAAGGACTCCCA A-3', reverse; 5'-CGGAATTCCTTGGAAA GTTGAGGAAGCA-3'。PCR産物をBamHIとEcoRIで制限酵素処理し、pSPT19ベクターにクローニングした後、塩基配列を確認した。得られたプラスミドを制限酵素処理したものを鋳型にDIG RNA labeling kit (Roche, Ltd., Basel, Switzerland)を用いてジゴキシゲニン標識RNAプロープを合成した。アンチセンス鎖合成にはSP6 RNAポリメラーゼを、センス鎖合成にはT7 RNAポリメラーゼを使用した。

### 2) *in situ* hybridization (ISH)

ISHではベントナHXシステムディスクバリー (Roche, Ltd.) とリボマップシステム (Roche, Ltd.) を使用した。プロトコールは標準的なものを使用し、プロープ濃度は50ng/slide、ハイブリダイゼーション条件は61℃、6時間とした。プロープを検出するために、1次抗体としてHRP標識抗DIG抗体 (Roche, Ltd.) を反応させ、2次抗体としてビオチン標識抗HRP抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, USA) を反応させた。Blue Map Kit (Roche, Ltd.) を用いてNBT/BCIPで発色した。対比染色はNuclear Fast Red (Roche, Ltd.) を使用した。

### 3) 免疫組織化学染色

パラフィン包埋した滑膜組織を2 μmに薄切し、組織切片を作製した。切片をキシ

レンとエタノールで脱パラフィンした後、0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/メタノールで室温、30分処理し、10%ヤギ正常血清で室温、30分処理した。1次抗体としてProkineticin 2 Antibody (Novus Biologicals, Littleton, USA) を使用し、PBSで250倍に希釈して、切片に滴下した後4℃で一晩反応させた。その後、PBSで洗浄し2次抗体としてヒストファイン ビオチン標識抗ウサギIgG抗体 (ニチレイバイオサイエンス, 東京) を室温で10分反応させ、ヒストファイン ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (ニチレイバイオサイエンス, 東京) を室温で5分反応させた。DABで発色した後、メチルグリーンで対比染色した。

### 4) real-time PCR

TRIzol (Invitrogen, Carlsberg, USA) を使用して各滑膜組織からtotal RNAを抽出し、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Carlsberg, USA) を用いてcDNAを合成した。逆転写反応はGene Amp PCR system 9700 (Applied Biosystems) 使用し、25℃で10分、37℃で120分、85℃で5秒の反応条件で行なった。real-time PCRはTaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems) とTaqMan Gene Expression Assays (Bv8; Hs01587689\_m1) (Applied Biosystems) またはPre-Developed TaqMan Assay Reagents Human ACTB (Applied Biosystems) を用い、7500 Real-time PCR System (Applied Biosystems) で行なった。反応条件は、50℃で2分 (UNG activation)、95℃で10分 (AmpliAq Gold activation)、95℃で15秒の後60℃で1分を50サイクル (Cycling condition) で行なった。1サンプルにつき2回測定を行ない、検量線法で発現量を検討した。内在性コントロール遺伝子としてβ-actinを使用した。

### 5) 統計学的検討

各滑膜におけるBv8の発現量の検討ではMann-Whitney's U test with Bonferroni 検

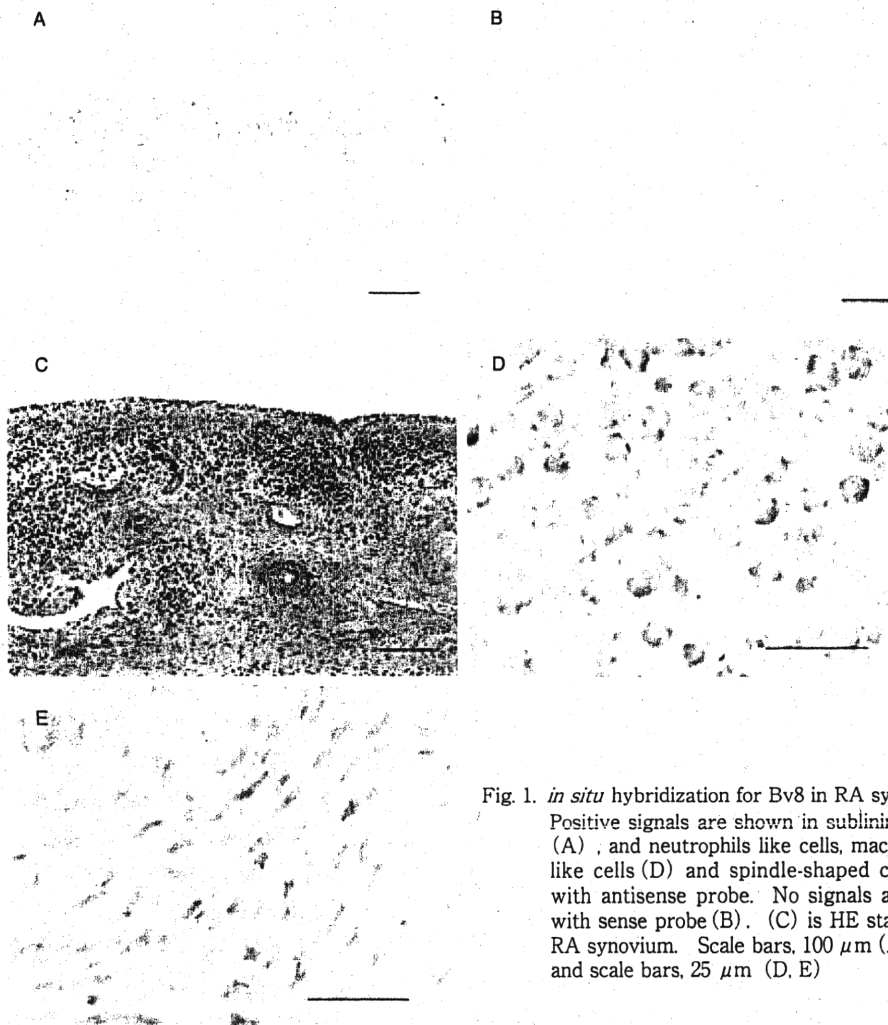


Fig. 1. *in situ* hybridization for Bv8 in RA synovium. Positive signals are shown in sublining layer (A), and neutrophils like cells, macrophage like cells (D) and spindle-shaped cells (E) with antisense probe. No signals are seen with sense probe (B). (C) is HE staining of RA synovium. Scale bars, 100  $\mu$ m (A, B, C) and scale bars, 25  $\mu$ m (D, E)

定を用いて有意差検定を行ない,  $p < 0.05$  以下を有意差ありと判定した.

### III. 結 果

#### 1. RA 滑膜組織における Bv8 の発現とその局在

##### 1) *in situ* hybridization

RA 滑膜組織での Bv8 mRNA の発現細胞を調べるために ISH を行なった. 低倍率で見ると表層よりやや深層の sublining layer

から深層にかけて陽性細胞を認めた (Fig. 1A). 高倍率では陽性細胞はマクロファージ様の大型の細胞や紡錘細胞, 好中球と思われる細胞など多彩な細胞であった (Fig. 1D, E). 新生血管周囲の細胞や内皮細胞での発色は認めなかった. 4 例の RA 滑膜で検討したが傾向は同じであった. しかし, 症例間で発色の程度に差がみられた. OA や外傷後滑膜でも同様の検討を行なったが, 陽性細胞はほとんどみられなかった.



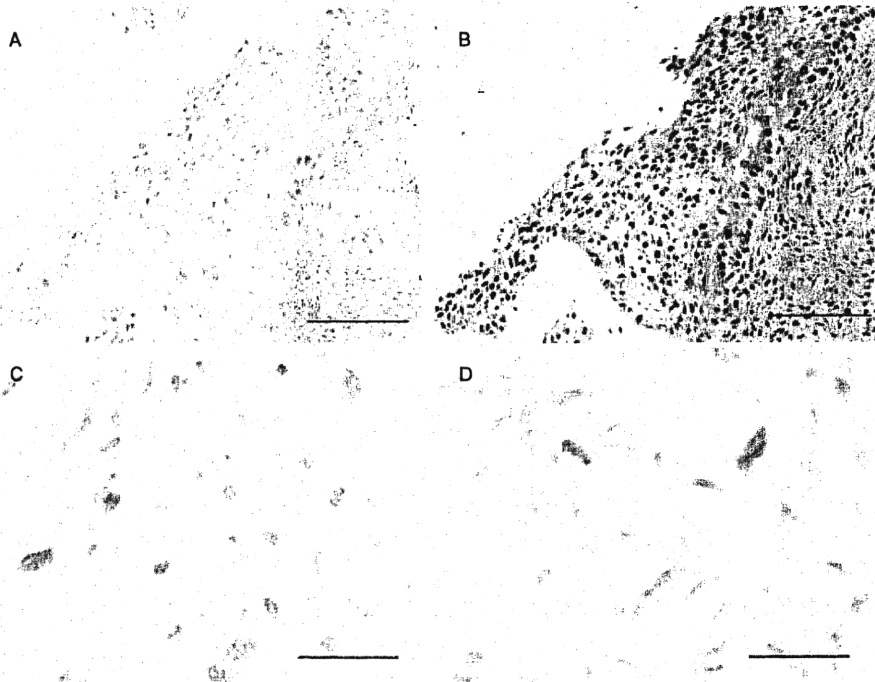


Fig. 2. Immunohistochemical staining for Bv8 in RA synovium. Bv8 protein is localized in sublining layer (A), and neutrophils like cells, macrophage like cells (C) and spindle-shaped cells (D). (B) is HE staining of RA synovium. Scale bars, 100  $\mu$ m (A, B) and scale bars, 25  $\mu$ m (C, D)

2) 免疫組織化学染色

RA 滑膜での Bv8 タンパクを検出するために免疫組織化学染色を行なった。低倍率で見ると、ISH と同様に sublining layer から深層に発色を認め (Fig. 2A), 高倍率では多彩な細胞での発色を確認できた (Fig. 2C, D)。

2. 外傷後, OA, RA 滑膜組織における Bv8 の発現量

外傷後, OA, RA 各群における Bv8 mRNA の発現量を real-time PCR を用いて検討した。OA 群の平均値を 1 として比較検討した。外傷後群で中央値 0.38 (0.15-0.93), OA 群で中央値 0.78 (0-2.82), RA 群で中央値 2.05 (0.22-97.35) であった (Fig. 3)。外傷後群では全体的に発現が低かった。一方, RA 群では外傷後群 ( $p=0.005$ ) や OA

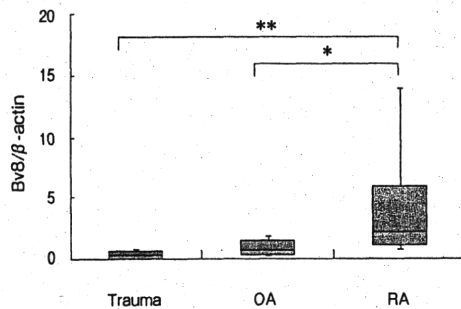


Fig. 3. Expression levels of Bv8 mRNA in trauma, OA and RA synovium. RNA was isolated from synovium of trauma (n=9), OA (n=13) and RA (n=18) patients. Bv8 mRNA expression was quantified by real-time PCR using  $\beta$ -actin RNA as an internal control. Values are the median and IQR. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ .

群 ( $p=0.029$ ) と比較して有意に高い Bv8 の発現がみられた。

#### IV. 考 察

本研究により Bv8 が RA 滑膜の sublining layer の多彩な細胞で発現しており, さらに外傷後滑膜や OA 滑膜と比較して RA 滑膜で有意に高く発現していることが示された。これらの結果から Bv8 が RA の病態に血管新生などを介して機能している可能性が示された。本研究は Bv8 と RA との関連を示した最初の報告である。

ISH や免疫組織化学染色による検討では, RA 滑膜で Bv8 の発現を認め, 特に sublining layer から深層に強い発現を認めた。一方, 外傷後滑膜や OA 滑膜ではほとんど発現がみられなかった。RA 滑膜における VEGF やアンジオポエチン等の血管新生因子は表層の滑膜細胞, マクロファージ様細胞, 紡錘形細胞で発現しており, 血管内皮細胞やその周囲でも発現していると報告されている<sup>13-18)</sup>。VEGF は血管内皮細胞の遊走・増殖および管腔形成の機能を持ち, 血管新生の中心的役割を担っている。また, アンジオポエチンは血管の成熟と安定化をもたらしている<sup>19)</sup>。Bv8 はこれらとは異なった局在を示しており, 新生血管に対して Bv8 が VEGF やアンジオポエチンとは違った機能をもつことも考えられる。Shojaei らは腫瘍のモデルマウスや腫瘍の細胞株を用いた実験で, 血管新生過程の早期に Bv8 が VEGF よりも早く機能することを示しており<sup>11, 20)</sup>。RA においても血管新生の早期に Bv8 が機能していることが推測される。現在, 倫理上の問題もあり RA の発症早期の滑膜を採取することは困難であり, この点について検討することは難しいが, RA の早期病変で Bv8 の発現がより亢進しているかもしれない。また, Shojaei らは, Bv8 が好中球を遊走させる作用も持つことを示しており<sup>11, 20)</sup>。Bv8 によって好中球のような炎症性細胞が RA 滑膜へ浸潤し炎症を増悪させている可能性もある。

Bv8 発現細胞はマクロファージや好中

球, 線維芽細胞様滑膜細胞 (fibroblast-like synoviocyte; FLS) と思われる細胞であった。マクロファージや好中球に関しては Shojaei らが, Bv8 を介した腫瘍の血管新生モデルで, 病変部のマクロファージや好中球の産生する Bv8 が局所での血管新生を促進すると同時に, 骨髄細胞自身の産生する Bv8 と共に骨髄細胞のこれらの細胞への分化と病変部への遊走を促進することを提示している<sup>21)</sup>。本研究により RA においてもこのモデルと同様の反応が推測される。さらに, FLS は RA の増殖滑膜を構成する細胞のひとつで, 炎症性サイトカインを産生し炎症性細胞を活性化し, また, MMP やカテプシンなどの蛋白分解酵素を産生することで軟骨破壊を引き起こしている<sup>22)</sup>。Bv8 が FLS で発現していることは Bv8 が RA の病態に深く関与していることを示唆している。

real-time PCR による検討により, RA 群の滑膜で外傷後群や OA 群と比較して有意に高く Bv8 が発現していることが明らかになった。今回収集した外傷後滑膜は受傷から 2~12 ヶ月 (平均 4.8 ヶ月) 経過したものであり, 組織学的に炎症所見はなく, ほぼ正常に近い滑膜と考えられる。一方, OA 滑膜ではその病態形成に炎症と血管新生が関わっている<sup>23)</sup>にもかかわらず, Bv8 の発現が低いことが示された。RA の症例間でも発現量に大きな差異がみられたため, この要因を検討するために組織学的に血管新生, 炎症性細胞浸潤, 線維化等を評価したが, 明確な発現量との関連性は認められなかった。また, 血液データや画像所見, 治療内容との関連も認められなかった。症例数を増やすことで何らかの傾向を見出すことができる可能性があるが, この点は今後の検討課題である。

近年, TNF- $\alpha$  を標的としたインフリキシマブやエタネルセプト, IL-6 を標的としたトシリズマブなどの生物学的製剤の登場により RA の治療が劇的に変化してきた。しかし,

効果が不十分な症例や重篤な副作用の出現などの問題もあり、より多くの治療法が開発され多角的に治療できることが望まれる。現在、腫瘍に対する治療薬として、ソラフェニブやベバシズマブなどの VEGF を標的とした血管新生阻害薬が開発・臨床応用されている<sup>1)</sup>。RA においても血管新生を標的とした新しい治療薬が開発される可能性があり、RA での血管新生の機序の解明が待たれる。本研究によって Bv8 がこの機序の一役を担っていることが示唆された。RA での Bv8 の機能をより詳細に証明していくことが今後の課題である。

稿を終えるに当たり、本研究の機会をお与えくださり、御指導、御校閲を賜りました岩手医科大学医学部整形外科学講座、嶋村 正教授に厚く御礼申し上げます。

また、貴重な研究材料を提供してくださいました岩手医科大学整形外科、国立病院機構盛岡病院整形外科、岩手県立久慈病院整形外科、岩手県立花巻厚生病院整形外科、岩手県立中部病院整形外科、松園第二病院整形外科、北上済生会病院整形外科、盛岡友愛病院整形外科の諸先生方に心から御礼申し上げます。

#### 文 献

- 1) Lainer-Carr D and Brahn E : Angiogenesis inhibition as a therapeutic approach for inflammatory synovitis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 3, 434-442, 2007.
- 2) Koch AE : Angiogenesis implication for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 41, 951-962, 1998.
- 3) Szekanez Z and Koch AE : Mechanisms of Diseases : angiogenesis in inflammatory diseases. *Nat Clin Pract Rheumatol* 3, 635-643, 2007.
- 4) Yoo SA, Kwok SK and Kim WU : Proinflammatory role of vascular endothelial growth factor in the pathogenesis of rheumatoid arthritis : prospects for therapeutic intervention. *Mediators Inflamm* 2008, 129873, 2008.
- 5) Clavel G, Valvason C, Yamaoka K, et al. : Relationship between angiogenesis and inflammation in experimental arthritis. *Eur Cytokine Netw* 17, 202-210, 2006.
- 6) Choi ST, Kim JH, Seok JY, et al. : Therapeutic effect of anti-vascular endothelial growth factor receptor I antibody in the established collagen-induced arthritis mouse model. *Clin Rheumatol* 28, 333-337, 2009.
- 7) Pap T and Distler O : Linking angiogenesis to bone destruction in arthritis. *Arthritis Rheum* 52, 1346-1348, 2005.
- 8) 山下彰久, 米満吉和 : 血管新生因子. *日本臨床* 63 (増刊号), 189-194, 2005.
- 9) Negri L, Lattanzi R, Giannini E, et al. : Bv8/Prokineticin proteins and their receptors. *Life Sci* 81, 1103-1116, 2007.
- 10) Shojaei F, Wu X, Zhong C, et al. : Bv8 regulates myeloid-cell-dependent tumour angiogenesis. *Nature* 450, 825-831, 2007.
- 11) Shojaei F, Singh M, Thompson JD, et al. : Role of Bv8 neutrophil-dependent angiogenesis in a transgenic model of cancer progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 2640-2645, 2008.
- 12) Kurosaka D, Noda K, Furuya K, et al. : Elevation of bombina variegata peptide 8 in mice with collagen-induced arthritis. *BMC Musculoskelet Disord* 10, 2009.
- 13) Ikeda M, Hosoda Y, Hirose S, et al. : Expression of vascular endothelial growth factor isoforms and their receptor Flt-1, KDR, and neuropilin-1, in synovial tissue of rheumatoid arthritis. *J Pathol* 191, 426-433, 2000.
- 14) Fearon U, Griosis K, Fraser A, et al. : Angiopoietins, growth factor, and vascular morphology in early arthritis. *J Rheumatol* 30, 260-268, 2003.
- 15) Wauke K, Nagashima M, Ishiwata T, et al. : Expression and localization of vascular endothelial growth factor-C in rheumatoid arthritis synovial tissue. *J Rheumatol* 29, 34-38, 2002.
- 16) Gravallesse EM, Pettit AR, Lee R, et al. : Angiopoietin-1 is expressed in the synovium of patients with rheumatoid arthritis and is induced by tumour necrosis factor  $\alpha$ . *Ann Rheum Dis* 62, 100-107, 2003.
- 17) Pohlars D, Huber R, Ukena B, et al. : Expression of platelet-derived growth factor C and D in the synovial membrane of patients with rheumatoid

- arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **54**, 788-794, 2006.
- 18) **Yoo SA, Yoon HJ, Kim HS, et al.** : Role of placenta growth factor and its receptor fit-1 in rheumatoid inflammation. *Arthritis Rheum* **60**, 345-354, 2009.
- 19) 柱本 照 : 血管新生因子 Angiopoietin-1 の多彩な機能. *Clin Rheumatol* **19**, 136-138, 2007.
- 20) **Shojaei F, Wu X, Qu X, et al.** : G-CSF-initiated myeloid cell mobilization and angiogenesis mediate tumor refractoriness to anti-VEGF therapy in mouse models. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 6742-6747, 2009.
- 21) **Shojaei F and Ferrara N** : Refractoriness to antivasculature endothelial growth factor treatment : role of myeloid cells. *Cancer Res* **68**, 5501-5504, 2008.
- 22) **Noss EH and Brenner MB** : The role and therapeutic implications of fibroblast-like synoviocytes in inflammation and cartilage erosion in rheumatoid arthritis. *Immunol reviews* **223**, 252-270, 2008.
- 23) **Bonnet CS and Walsh DA** : Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation. *Rheumatology* **44**, 7-16, 2005.

## Expression of Bv8 in rheumatoid arthritis synovium

Shinya OIKAWA<sup>1), 2)</sup>, Akihisa KAMATAKI<sup>1)</sup>, Yoshikuni MIMATA<sup>1), 2)</sup>,  
Kenya MURAKAMI<sup>1), 2)</sup> and Takashi SAWAI<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Pathology, School of Medicine,  
Iwate Medical University, Morioka, Japan

<sup>2)</sup> Department of Orthopaedic Surgery, School of Medicine,  
Iwate Medical University, Morioka, Japan

(Received on January 13, 2010 & Accepted on January 26, 2010)

### Abstract

Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic, inflammatory, autoimmune disease, inducing joint destruction. Pathologically, RA is characterized by proliferation of synovial cells, infiltration of inflammatory cells, destruction of cartilage and bone, and angiogenesis. Neovascularity supplies nutrients and oxygen, recruits cytokines and inflammatory cells to synovial membrane, and then develops the pannus. Thus, angiogenesis is an important process in the pathogenesis of RA. Bv8/Prokineticin2 is a new protein with diverse regulatory roles, including

angiogenesis. In our study, we investigated the localization of Bv8 in RA synovium by *in situ* hybridization and immunohistochemical staining, and Bv8 mRNA expression level in RA, osteoarthritis (OA) and trauma synovium by real-time PCR. Bv8 was expressed in various cells in the sublining and deep layer of synovium. Bv8 mRNA level in RA synovium was significantly higher than that in OA and trauma synovium. These results suggest that Bv8 may play a role in RA pathogenesis.

Journal of Joint Surgery

# 関節外科

基礎と臨床

別刷

Vol.29 No.12, 2010

原著論文

## 実験的変形性膝関節症に対する 高分子量ヒアルロン酸（平均分 子量270万HA）スベニール<sup>®</sup>と 架橋型ヒアルロン酸（Hylan G- F 20）SYNVISC<sup>®</sup>の作用比較

石黒直樹 岩館克治 澤井高志

〒162-0845 東京都新宿区市谷本村町2-30

TEL 03-5228-2061 FAX 03-5228-2062 (編集部)

<http://www.medicalview.co.jp>

 メジカルビュー社

# 実験的変形性膝関節症に対する高分子量ヒアルロン酸 (平均分子量270万HA)スベニール®と架橋型ヒアル ロン酸(Hylan G-F 20)SYNVISC®の作用比較

石黒直樹 岩館克治 澤井高志

## はじめに

変形性関節症 (osteoarthritis ; OA) は加齢に伴い徐々に関節の軟骨基質が変性・喪失することにより、関節の機能低下、疼痛をきたす関節疾患であり、高齢者の日常生活動作 (ADL) や生活の質 (QOL) を低下させ、健康寿命を短縮させる重大な運動器機能疾患として位置づけられており、わが国でも潜在患者数は2,400~3,000万人、有症患者数は820~1,000万人と推定されている<sup>1),2)</sup>。

現在、OAに対する保存療法としては、主として非薬物療法と薬物療法が行われており、保存療法に抵抗する患者に対しては関節置換術などの手術が施行される。薬物療法の目的は疼痛の緩和であり、鎮痛薬、非ステロイド性抗炎症

薬 (NSAIDs)、ステロイドおよびヒアルロン酸 (HA) の関節内注射などの治療が行われている。

世界各国における多くの臨床試験成績から得られたHAの関節内注射の有効性、安全性に関するエビデンスに基づき、OA研究で世界最高水準である国際変形性関節症学会 (Osteoarthritis Research Society International ; OARSI) よりOA治療ガイドラインが公表された<sup>3)</sup>。このなかでHA関節内注射はOAにおける積極的な治療選択肢の1つとして6段階カテゴリーの最上位のIaのエビデンスレベルで効果サイズ (ES) 0.6として推奨されている (ES=0.2 : small, ES=0.5 : moderate, ES>0.8 : large)。このことからわかるようにHA関節内投与はOAの標準治療である。

OAでは関節軟骨の変性に伴い軟骨の細胞外基質であるプロテオグリカンやコラーゲンの分解物が関節液中に遊離し、これらの分解産物やサイトカインなどの関与により二次性の滑膜炎が引き起こされる<sup>4),5)</sup>。

健康人の関節液中のHA分子量は350~500万、濃度は2.5~4mg/mLであるが<sup>6)</sup>、OA患者の関節

## Key words

ヒアルロン酸 (hyaluronan, hyaluronic acid)  
変形性膝関節症 (osteoarthritis, knee)  
関節内注射 (intra-articular injection)  
疼痛 (pain)  
軟骨変性 (cartilage degeneration)

Comparative investigation for the effects of high molecular weight hyaluronic acid (Suvenyl® : HA with average molecular weight of 2.7 million dalton) and cross-linked hyaluronic acid (SYNVISC® : Hylan G-F 20) on the experimental knee osteoarthritis model in rabbits

N. Ishiguro : 名古屋大学大学院医学系研究科整形外科学 ; K. Iwadata : 新薬開発研究所中央研究所 ; T. Sawai : 岩手医科大学病理学

液では軟骨破壊、炎症に伴い関節液の浸出・貯留や滑膜および軟骨組織からのHA合成の低下、HA分子の低分子化をきたし、HAの分子量および濃度の低下が認められ<sup>7)</sup>、関節液の粘弾性が損なわれる。

HAにはその優れた粘弾性特性に基づきOA病態の進行に伴い低下・喪失した関節液の粘弾性を補充・回復させる作用があり、関節潤滑作用および衝撃緩和作用に対する改善効果が認められる<sup>8)~10)</sup>。

しかし、HAにはそれ以外に関節内で働く生理活性物質としての作用が多数報告されている<sup>11)~18)</sup>。関節内HA注射療法には、OA患者関節液の粘弾性の低下を補充するだけでなく、炎症が起こっている関節包・滑膜組織や変性軟骨組織への浸透性を介して、関節包・滑膜細胞および軟骨細胞に直接作用することにより、関節の炎症および疼痛を軽減するとともに軟骨変性進行を抑制する効果も期待される<sup>19), 20)</sup>。事実、分子量270~367万HAの高分子量HAであるスベニール®(270万HA)についてはウサギOAモデルで、関節内軟骨・滑膜組織への経時的組織浸透性を検討した結果、投与後短時間のうちに滑膜および変性軟骨組織に十分量浸透することが明らかとなっている<sup>19)</sup>。以上を考え合わせると、関節内に投与されたHAは単なる潤滑効果に留まらず、なんらかの薬理作用を発揮する可能性がある。

一方、欧米ではHAの注射による関節液の粘弾性回復が疼痛軽減に最も重要な役割を果たすとの観点から、HA関節注入薬をviscosupplement (lubricant)として位置づけ、医薬品ではなくdeviceとして承認されているケースが多い。

しかしdeviceとして承認されているHA製剤のなかには比較的分子量が小さいものも多く、これらの比較的分子量の低いHA製剤では、単なるviscosupplementとしてOA病態進行に伴い低下した関節液の粘弾性を回復させることで、関節疼痛を軽減する作用を発揮するとの説明には無理がある。これらの比較的分子量の低いHA製剤

でもこれまで多くの臨床試験でOA患者の関節疼痛に対する改善効果が報告されており<sup>21)~23)</sup>、関節液の粘弾性の低下に対する補充という考え方のみでOAにおけるHA製剤の疼痛軽減効果を説明することは困難である。

これに対し、粘弾性が最も重要との観点から、粘性、弾性およびレオロジー特性が高く、関節内滞留時間が長くなるようにヒアルロン酸を架橋化した高分子SYNVISC® (Hylan G-F20)が設計された。鶏冠からの抽出物にホルムアルデヒドを加え、夾雑蛋白を介してHA分子を架橋させた分子量約600万HAの水溶液であるHylan Aと、Hylan Aをさらにdivinyl sulphoneで架橋させた分子量計測不能のHylan Bの混合物である。Hylan AおよびBのそれぞれの関節内での半減期は1.5日および8.8日<sup>24)</sup>であり、関節内滞留時間は28日以上と報告している<sup>25)</sup>。

Hylan G-F20は関節内に長時間滞留し、関節内組織である滑膜組織、脂肪体、軟骨組織への移行性はきわめて遅いとされている。つまり、Hylan G-F20は関節液への粘弾性補充による関節の侵害受容体の被覆作用を介した物理的な治療効果、関節潤滑改善効果および衝撃緩和作用に基づき、関節疼痛の軽減効果を示すと想定され、HAの本来もつ生理活性にはまったく重きをおいていない。

本試験ではウサギOAモデルを用いて、それぞれの臨床的な用法・用量に基づき用量、投与間隔および投与回数を設定し、270万HAおよびHylan G-F20を膝関節腔内に投与し、両薬剤の疼痛および軟骨損傷に対する作用を比較検討した。

## 試験材料および方法

### ● 被検物質、比較対照物質および対照物質

被検物質として270万HA製剤(スベニール®バイアル関節注25mg; SVE, Lot No. U8L05, 中外製薬(株))を用いた。SVEは平均分子量270万



HAのヒアルロン酸ナトリウムを含む製剤であり、1バイアル(2.5mL)中にヒアルロン酸ナトリウムを1%(25mg)含有する。

比較対照物質には Hylan G-F20 (SYNVISC®hylan G-F20; SYN, Lot No. Y07101, Genzyme Corporation, USA)を用いた。SYNは hylan A(平均分子量600万HA)を80%, hylan B(水和ゲル)を20%含むhylan polymersの製剤であり、1シリンジ(2.0mL)中にhylan polymersを16mg含有する。

陰性対照物質には生理食塩液(Saline, 大塚生食注, Lot No. K9G90, (株)大塚製薬工場)を用いた。

### ● 使用動物および飼育方法

13週齢のKbl:JW(SPF)系ウサギ、雄28匹を北山ラベス(株)より購入した。動物は入荷から群分け日まで検疫および馴化を行った。動物の一般状態、体重推移に異常は認められなかった。

動物は馴化期間を含め試験実施期間を通じ、ステンレス製可動ラックに装着したFRP製ケージに個別に収容し、温度 23±5℃、湿度 50±20%、換気回数13~20回/時間、照明時間8:00~20:00(明12時間、暗12時間)の設定環境下で飼育した。飼料は固形飼料RC4(オリエンタル酵母工業(株))を約150g/dayの制限給餌として与え、飲料水は水道水を自由に与えた。動物の個体識別は耳介に油性フェルトペンで個別識別番号を記入して行い、群分け前は性別および個体識別番号を記入したカードを、群分け後は試験番号、投与群、用量、性別、動物番号、投与期間、手術日、剖検日および個体識別番号を記入したカードを付けた。

### ● 動物の選択および群分け

手術・投与開始日の前日(入荷後7日)に群分けした。群分け日に全例の体重と両後足重量配分を測定した。測定した両後足重量配分より左後足重量配分比[(左荷重/両側合計荷重)×100%]を算出した。群に割り付ける動物は、馴化期間

中の観察において一般状態に異常のなかった動物より、左後足重量配分比を基準とし、個体値が平均値に近い順に24匹を選択した。選択した動物は左後足重量配分比による層別連続無作為化法を用いて各群に割り付けた。左後足重量配分比の平均値が各群で同様の値を示し、群間に差がないことを確認後、体重についても平均値が各群で同様の値を示し、群間に差がないことを確認した。

### ● 変形性関節症モデルの作製(半月板部分切除)

半月板切除手術は群分けの翌日に行った。半月板部分切除手術日を術後0日と定義した。14~15週齢の動物を用い、館田ら<sup>26)</sup>および野地ら<sup>27)</sup>の方法に従い、半月板部分切除変形性関節症モデルを作製した。塩酸ケタミン(ケタラール®筋注用500mg, 第一三共プロファーマ(株))およびキシラジン(スキルペン®2%注射液, (株)インターベット)の併用麻酔下でウサギの左膝関節部を除毛し、北島式固定器((株)夏目製作所)に背位固定した。除毛部をイソジン®液(明治製菓(株))および消毒用エタノールで消毒した後、膝蓋の外側直下皮膚に約2cmの切開を加え、外側側副靭帯を露呈させた後、この靭帯を切除した。さらに、膝窩筋起始部の腱を切断することにより外側半月板を露呈させ、半月板のほぼ中央部を3.0~4.0mmにわたり切除した。その後、皮下筋層と皮膚をそれぞれ結節縫合し、アンピシリン®(ピクシリンゾル-15%明治, 明治製菓(株))約0.2mLを大腿部筋肉内に注射した。

### ● 投与液の調製および保存

被検物質、比較対照物質および陰性対照物質とも調製は行わず、そのまま使用した。ただし、一度開封した容器中の被検物質または対照物質は投与1日限りの使い切りとし、再使用しなかった。

### ● 実験のデザイン

#### ◆ 群構成

5日間隔でSalineを5回関節腔内投与する対照

群, SVEを5回関節腔内投与するSVE投与群およびSYNを3回関節腔内投与するSYN群の計3群を設定した。各投与物質は術後0日(手術当日の手術終了後)に初回投与し, 以降5日間隔で投与回数にしたがって投与した。動物数は1群当たり8匹とした。剖検日(膝関節摘出日)は術後25日とした。

群構成を表1に示した。

#### ◆ 関節腔内投与

臨床投与量の用量比から換算し, SalineおよびSVEは0.1mL/kg, SYNは0.08mL/kgを投与用量とした。各投与物質を手術側(左側)膝関節腔内に1mL注射筒(テルモシリンジ1mLツベルクリン用, (株)テルモ)および26G注射針を用いて投与した。投与液量は投与日に測定した体重に基づき液量換算法により個別に算出した。投与時刻は手術日では全例の手術終了後とし, 以降は9:00~13:00とした。

#### ● 疼痛評価および膝関節軟骨組織評価

##### ◆ 疼痛評価

小動物用鎮痛評価装置(incapacitance tester)に対する馴化として, 入荷後1~6日の毎日, 全

例について動物を本体容器(ホルダー)に入れ5秒間静止させる操作を行った。

手術前日, 術後1, 6, 11, 16, 21, 24日(剖検前日)の7回, 両後足重量配分を測定した。

両後足重量配分の測定には, 小動物用鎮痛評価装置(Linton Instrument社製)(図1)を用いた。

動物をウサギ用本体容器(ホルダー)内に移動し, 動物の静止状態で測定し(1度目), 次に動物をホルダーから出し, 再度入れて静止状態で測定し(2度目), この操作を再度繰り返した(3度目)。3度測定した両後足重量配分のそれぞれについて, 左右重量(荷重)から左後足重量配分比(%)を次式により算出した。

$$\text{左後足重量配分比(\%)} = \frac{\text{左荷重(g)}}{\text{右荷重(g)} + \text{左荷重(g)}} \times 100$$

3度算出した左後足重量配分比(%)の平均値を, 測定1回当たりの左後足重量配分比(%)と定義した。

##### ◆ 膝関節の摘出・固定

剖検日に安楽死させたウサギの左(手術)側膝関節部位の大腿骨顆部および脛骨顆部を摘出し

表1 群構成

群名	投与物質	用量 (mL/kg)	投与 間隔	膝関節腔内投与回数 (投与日)	剖検日 (術後)	動物数	動物番号
対照	Saline	0.1	5日	5回(術後0, 5, 10, 15, 20日)	25日	8	101~108
SVE	270万HA	0.1	5日	5回(術後0, 5, 10, 15, 20日)	25日	8	201~208
SYN	Hylan G-F20	0.08	5日	3回(術後0, 5, 10日)	25日	8	301~308

図1 Incapacitance Tester



た。摘出組織は0.5%セチルピリジニウムクロライド含有10%中性緩衝ホルマリン液にて固定した。

#### ◆ 肉眼的観察

写真撮影終了後、大腿骨と脛骨の傷害局所である外側顆を食品包装用ラップフィルムで覆い、肉眼的病変(傷害)の発現範囲をトレースすることにより、傷害範囲の面積を以下のように測定した。

傷害面積をトレースした原紙をスキャナーでコンピュータに取り込み、傷害部を黒色に塗りつぶした後、汎用画像処理ソフト「Magical IP」(マジカルアート(株))を用いてドット数を計数し、同時に測定した100mm<sup>2</sup>のドット数から面積(mm<sup>2</sup>)を換算した。

#### ◆ 病理組織標本作製

10%EDTA液(pH7.4)で脱灰後、大腿骨および脛骨における両側顆の一定部位(膝窩筋起始部より5mm遠位の大腿骨顆部横断面および脛骨顆部中央部横断面)についてパラフィン切片を作製し、サフラニンO染色(サフラニンO, ファス

トグリーンおよび鉄ヘマトキシリン重染色)を行った。

#### ◆ 関節軟骨病変の病理組織学的評価

病理組織学的検査は光学顕微鏡(BHS, オリンパス光学工業(株))を用いて行った。大腿骨外側顆および脛骨外側顆の一定部位の標本を用い、軟骨変性を表2の評価基準に従い評価した。

すなわち、軟骨変性を定量的に評価するため、Colomboらの評価法<sup>28)</sup>を一部改変したKikuchiらの評価基準<sup>20)</sup>に従い、表層の消失、軟骨びらん、粗造化/亀裂、プロテオグリカン染色性(サフラニンO染色性)低下、軟骨細胞配列不整、軟骨細胞消失、軟骨下骨露出、(軟骨細胞の)房状集簇形成の8項目について+1~+4の4段階で評価した。8項目の評価点の総和を総合組織学的評点(総合評点と略)とした。なお、Kikuchiらの評価基準において、Slight, Moderate, Focally severeなどで表現され、具体的な基準のない所見については、表3に示した「関節軟骨病変評価基準の詳細」を設定して評価した。

また、関節軟骨におけるプロテオグリカンの

表2 関節軟骨病変の評価基準

Finding	Score			
	+1	+2	+3	+4
Loss of superficial layer	<Slight	Moderate	Focally severe	Extensively severe
Erosion of cartilage	<Detectable	Moderate	Focally severe	Extensively severe
Fibrillation and/or fissures	<Noticeable (<1 very small)	Moderate (1 small)	Marked (2 small or 1 medium)	Extensive (3 small, 2 medium or 1 large)
Loss of proteoglycan	<Paler stain than control	Moderate loss of safraninophilia	Moderate loss of safraninophilia	Total loss of safraninophilia
Disorganization of chondrocytes	Noticeable	Moderate, with some loss of columns	Marked loss of columns	No recognizable organization
Loss of chondrocytes	<Noticeable decrease in cells	Moderate decrease in cells	Marked decrease in cells	Very extensive decrease in cells
Exposure of subchondral bone	<Focal exposure of bone	Moderate exposure of bone	Fairly extensive exposure of bone	Very extensive exposure of bone
Cluster formation*	<3~4 small, or 1~2 medium	5~6 small, 3~4 medium or 1~2 large	7 or more small, 5~6 medium or 3~4 large	7 or more medium or 5~6 large

\* : Small ; 2~4 cells, Medium ; 5~8 cells, Large ; 9 or more cells

**表3** 関節軟骨病変評価基準の詳細

[1] 評価部位  
外側顆：大腿骨は外側3/4の関節軟骨領域，脛骨は外側2/3の関節軟骨領域。

[2] 評価基準の詳細

所見	評点	基準の詳細
Erosion of cartilage (軟骨ひらん) Fibrillation and/or fissures (粗造化/亀裂)	0	変化なし
	1	「表層から中間層に限局した病変(A)」が評価部位の幅の1/3以下にみられる
	2	(A)が1/3~2/3に、または「深層に波及した病変(B)」が評価部位の幅の1/3以下にみられる
	3	(A)が2/3以上に、または(B)が1/3~2/3にみられる
	4	(A)が1に、または(B)が2/3以上にみられる
Loss of superficial layer (表層の消失) Loss of proteoglycan (プロテオグリカン染色性低下) Disorganization of chondrocytes (軟骨細胞配列不整)	0	変化なし
	1	病変の発現領域が評価部位の1/4以下を占める
	2	病変の発現領域が評価部位の1/4~2/4を占める
	3	病変の発現領域が評価部位の2/4~3/4を占める
	4	病変の発現領域が評価部位の3/4以上を占める
Loss of chondrocytes (軟骨細胞消失) Exposure of subchondral bone (軟骨下骨露出)	0	変化なし
	1	病変の発現領域が評価部位の1/8以下を占める
	2	病変の発現領域が評価部位の1/8~1/3を占める
	3	病変の発現領域が評価部位の1/3~2/3を占める
	4	病変の発現領域が評価部位の2/3以上を占める
Cluster formation (房状集簇形成)	0	変化なし
	1	原表の基準どおり
	2	原表の基準どおり
	3	原表の基準どおり
	4	原表の基準どおり

消失領域を示唆する「サフラニンO不染領域の幅」を、倍率20倍で接眼マイクロメータ(1mm, 100等分)を用いて、その目盛数(20目盛=1mm)を計測した。

● 統計処理

左後足重量配分比，肉眼的傷害面積およびサフラニンO不染領域の幅については，F検定により等分散性の検定を行い，等分散の場合はStudentのt検定を，不等分散の場合はAspin-Welchのt検定を行った。病理組織学的検査における評価項目の項目別評点と総合評点についてはMann-WhitneyのU検定を行った。有意水準はF検定では危険率5%，t検定およびMann-

WhitneyのU検定では危険率5および1%とした。

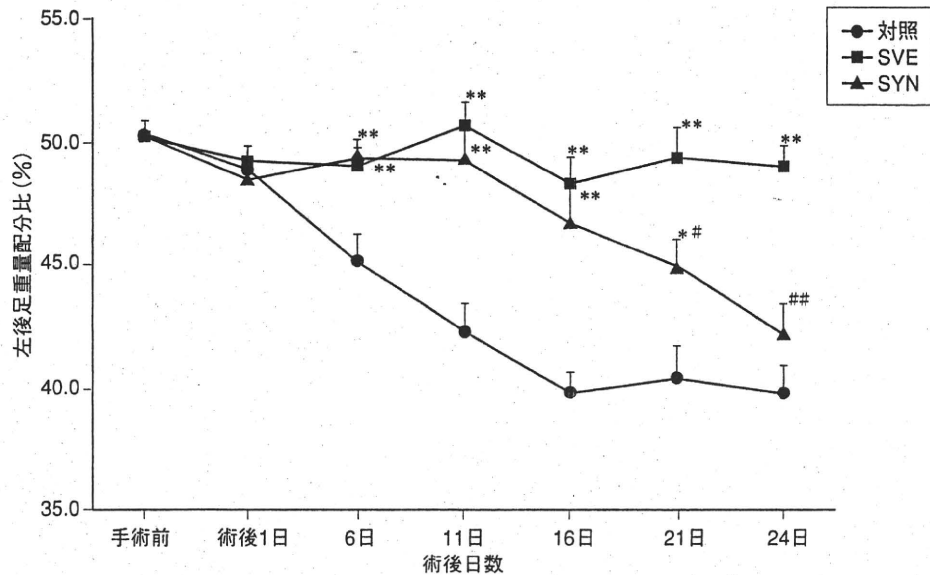
**結果**

● 疼痛評価

投与開始前(手術前日)および投与期間中(術後1, 6, 11, 16, 21, 24日<剖検前日>)に測定した左後足重量配分比を図2, 表4に示す。

対照群の左後足重量配分比(平均±標準誤差)は手術前では50.4±0.5%であったが，術後16日まで疼痛発現に伴い経時的に低下し(術後1, 6, 11および16日でそれぞれ48.9±0.9%, 45.2±1.0%, 42.3±1.1%および39.9±0.8%)，術後21

**図2** ウサギ膝関節半月板部分切除による実験的変形性関節症に対する270万HA (SVE)とHylan G-F20 (SYN)の作用比較-左後足重量配分比-



各値は平均±標準誤差を示す(n=8)。  
 \* : p<0.05, \*\* : p<0.01, 対照群と比較して有意差あり(t検定)  
 # : p<0.05, ## : p<0.01, SVE投与群と比較して有意差あり(t検定)

**表4** ウサギ膝関節半月板部分切除による実験的変形性関節症に対する270万HA (SVE)とHylan G-F20 (SYN)の作用比較-左後足重量配分比-

群	投与量 (mL/kg)	動物数	術後日数							
			手術前	1	6	11	16	21	24	
対照	Saline 0.1	8	50.4±0.5	48.9±0.9	45.2±1.0	42.3±1.1	39.9±0.8	40.5±1.3	39.9±1.2	
SVE	270万HA 0.1	8	50.3±0.5	49.2±0.7	49.1±0.8**	50.8±0.9**	48.4±1.1**	49.5±1.2**	49.1±0.9**	
SYN	Hylan G-F20 0.08	8	50.4±0.4	48.5±0.8	49.4±0.7**	49.4±1.4**	46.8±1.5**	45.0±1.0**	42.3±1.1**	

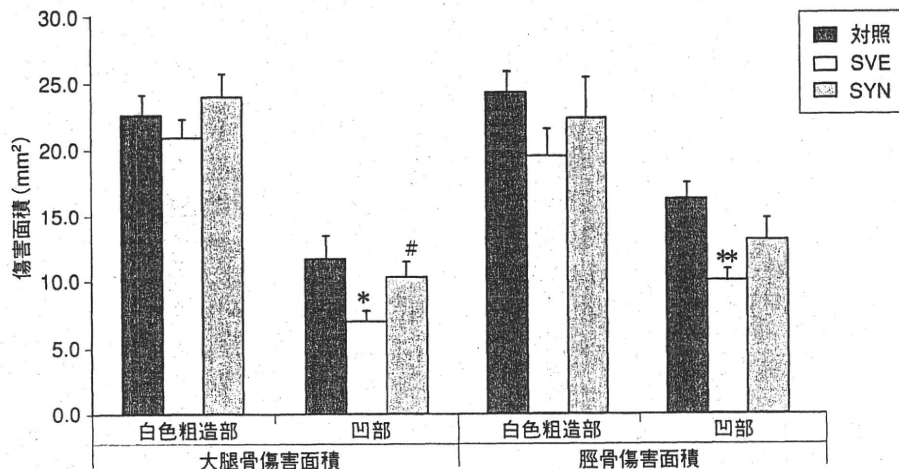
† : 左後足重量配分比(%), 平均±標準誤差  
 \* : p<0.05, \*\* : p<0.01, 対照群と比較して有意差あり(t検定)  
 # : p<0.05, ## : p<0.01, SVE投与群と比較して有意差あり(t検定)

日以降は術後16日とほぼ同様の値であった。  
 SVE投与群の左後足重量配分比は、投与期間中手術前値(50.3±0.5%)がほぼ維持され、対照群と比較し、術後6, 11, 16, 21および24日において有意な高値(それぞれ49.1, 50.8, 48.4, 49.5および49.1%)が認められ、疼痛が抑制されていることが示唆された。  
 SYN投与群の左後足重量配分比は術後16日(投与終了後6日)以降で経時的に低下したが、対照群と比較し術後6, 11, 16および21日では

有意な高値(それぞれ49.4, 49.4, 46.8および45.0%)を示した。しかし術後24日では42.3%の値を示し、有意な差は認められなかった。一方、SVE投与群との比較では術後21および24日で有意な低値が認められ、SYN投与期間中は荷重が可能であるが、投与終了後は荷重できていないことが示された。これは疼痛の抑制効果が、投与終了後に減弱している可能性を示すと判断された。



**図3** ウサギ膝関節半月板部分切除による実験的変形性関節症に対する270万HA (SVE)とHylan G-F20 (SYN)の作用比較—傷害面積—



各値は平均±標準誤差を示す(n=8)。  
 \* : p<0.05, \*\* : p<0.01, 対照群と比較して有意差あり(t検定)  
 # : p<0.05, SVE投与群と比較して有意差あり(t検定)

**表5** ウサギ膝関節半月板部分切除による実験的変形性関節症に対する270万HA (SVE)とHylan G-F20 (SYN)の作用比較—傷害面積—

群	投与量 (mL/kg)	動物数	大腿骨		脛骨	
			白色粗造部	凹部	白色粗造部	凹部
対照	Saline 0.1	8	22.42±1.55†	11.53±1.89	24.16±1.49	16.17±1.24
SVE	270万HA 0.1	8	20.73±1.43	6.75±0.97*	19.36±2.12	9.81±0.98**
SYN	Hylan G-F20 0.08	8	23.85±1.72	10.15±1.24#	22.24±3.06	13.00±1.54

† : 傷害面積(mm²), 平均±標準誤差を示す  
 \* : p<0.05, \*\* : p<0.01, 対照群と比較して有意差あり(t検定)  
 # : p<0.05, SVE投与群と比較して有意差あり(t検定)

● 関節軟骨の肉眼的所見および傷害面積

大腿骨および脛骨の傷害面積を**図3**, **表5**に示した。

◆ 大腿骨外側顆

対照群の傷害面積(平均±標準誤差)は白色粗造部が22.42±1.55mm<sup>2</sup>, 凹部が11.53±1.89mm<sup>2</sup>であった。

SVE投与群の傷害面積は対照群と比較し, 白色粗造部は20.73±1.43mm<sup>2</sup>とほぼ同様の値を, 凹部では6.75±0.97mm<sup>2</sup>と有意な低値を示した。

SYN投与群の傷害面積は対照群と比較し, 白色粗造部および凹部ともほぼ同様の値(23.85±1.72

および10.15±1.24mm<sup>2</sup>)を示し有意な差は認められなかった。SVE投与群とSYN投与群の比較では, 白色粗造部ではほぼ同様の値を示したが, 凹部の傷害面積はSYN投与群が有意な高値を示した。

◆ 脛骨外側顆

対照群の傷害面積(平均±標準誤差)は白色粗造部が24.16±1.49mm<sup>2</sup>, 凹部が16.17±1.24mm<sup>2</sup>であった。

SVE投与群では対照群と比較し, 大腿骨で凹部の有意な低値, 脛骨で白色粗造部の低値傾向と凹部の有意な低値が認められた。SYN投与群では対照群と比較し有意の差が認められなかった。

## ● 関節軟骨の病理組織学的所見

### ◆ 大腿骨外側顆関節軟骨

対照群では、軟骨病変の総合的指標である総合評点は $19.9 \pm 0.7$ であった。また、サフラニンO不染領域の幅は $44.5 \pm 2.6$ 目盛(20目盛=1mm;  $2.23 \pm 0.13$ mm)であり軟骨変性が観察された。

SVE投与群では、対照群と比較して、表層の消失、軟骨細胞配列不整および軟骨細胞消失に有意な低値が認められ、総合評点は $16.1 \pm 1.4$ で低値傾向を示した。サフラニンO不染領域の幅は $33.6 \pm 3.7$ 目盛( $1.68 \pm 0.19$ mm)で、対照群と比較し有意に低値であり、軟骨の変性抑制が認められた。

SYN投与群では、対照群と比較し、総合評点は $20.0 \pm 0.9$ とほぼ同様の値を示し、サフラニンO不染領域幅も $44.1 \pm 3.3$ 目盛( $22.1 \pm 0.17$ mm)とほぼ同様の値であり、対照群と同等の軟骨変性が認められた。

SVE投与群とSYN投与群の比較では、SYN投与群でプロテオグリカン染色性低下、軟骨細胞配列不整および軟骨細胞消失に有意な高値が認められ、総合評点で3.9ポイントおよびサフラニンO不染領域の幅が10.5目盛(0.53mm)増加し、SYN投与群でいずれも高値を示し、SVE投与群と比較して高度な軟骨変性が認められた。

### ◆ 脛骨外側顆関節軟骨

対照群では、軟骨病変の総合評点は $23.1 \pm 0.5$ であった。また、サフラニンO不染領域の幅は $58.8 \pm 1.0$ 目盛( $2.94 \pm 0.05$ mm)であり、軟骨変性が観察された。

SVE投与群では、対照群と比較して、表層の消失、軟骨びらん、粗造化/亀裂およびプロテオグリカン染色性低下の各項目で有意な低値が認められ、総合評点は $20.0 \pm 1.1$ で低値傾向を、サフラニンO不染領域の幅は $50.1 \pm 3.5$ 目盛( $2.51 \pm 0.06$ mm)と有意な低値を示し、軟骨変性抑制が認められた。

SYN投与群では、対照群と比較して、総合評点は $22.5 \pm 1.6$ でほぼ同様の値を示し、サフラニ

ンO不染領域の幅は $52.0 \pm 5.3$ 目盛( $2.60 \pm 0.27$ mm)と軟骨変性抑制傾向が認められたのみであった。

大腿骨と脛骨関節軟骨で観察された各群の軟骨変性を病理組織学的に比較検討した結果を表6に示す。

## 考察

ウサギの膝関節半月板部分切除による変形性関節症(OA)モデルを用いて、270万HAおよびHylan G-F20を関節腔内投与し、両薬剤の疼痛および軟骨損傷に対する作用を比較検討した。本試験実施にあたっては、両薬剤それぞれの臨床的な用法・用量に基づき用量、投与間隔および投与回数を設定した(5日間隔で270万HAは5回、Hylan G-F20は3回)。

本モデルで、対照群の左後足重量配分比は経時的に低下したが、これは手術側(左側)膝関節の軟骨変性の進行に伴い、疼痛が誘起されたことによるものと考えられた。270万HA投与群では投与期間中左後足重量配分比は手術前値がほぼ維持され、対照群と比較して術後6, 11, 16, 21および24日のいずれの測定日においても有意な高値すなわち疼痛の軽減効果が認められた。Hylan G-F20投与群では術後11日までは左後足重量配分比は手術前値がほぼ維持されたが、術後16日(投与終了後6日)以降で左後足重量配分比が経時的に低下し、対照群との比較では術後6~21日で有意な高値を示したものの、270万HA投与群と比較すると有意な左後足重量配分比の低値が認められ、疼痛抑制効果の減弱が示唆された。すなわち、Hylan G-F20投与群では投与期間中は疼痛抑制効果を認めるが、投与終了後は経時的に疼痛抑制効果が減弱している可能性が考えられた。

ウサギOAモデルでの疼痛軽減効果の検討期間にはHylan G-F20の最終投与後2週間に過ぎず、その関節内滞留時間から考えると投与終了後効果が減弱することは予測に反していた。Hylan G-F20

**表6** ウサギ膝関節半月板部分切除による実験的変形性関節症に対する270万HA (SVE)とHylan G-F20 (SYN)の作用比較—病理組織学的検査：関節軟骨病変の評価—

器官	部位	所見	群	対照	SVE	SYN
			関節腔内投与	Saline 0.1mL/kg	270万HA 0.1mL/kg	Hylan G-F20 0.08mL/kg
			動物数	8	8	8
大腿骨関節軟骨	外側顆	表層の消失		3.1±0.1	2.5±0.3*	3.1±0.2
		軟骨ひらん		2.3±0.2	1.9±0.2	2.3±0.2
		粗造化/亀裂		2.6±0.2	2.0±0.3	2.6±0.2
		プロテオグリカン染色性低下		2.6±0.2	2.0±0.3	2.8±0.2*
		軟骨細胞配列不整		3.1±0.1	2.3±0.3**	3.0±0.2*
		軟骨細胞消失		2.9±0.1	2.3±0.3*	2.9±0.1*
		軟骨下骨露出		0.1±0.1	0.1±0.1	0.1±0.1
		房状集簇形成		3.1±0.1	3.1±0.2	3.3±0.3
		総合組織学的評点(総合評点)		19.9±0.7	16.1±1.4	20.0±0.9
		サフラニンO不染領域の幅		44.5±2.6	33.6±3.7*	44.1±3.3
脛骨関節軟骨	外側顆	表層の消失		3.9±0.1	3.1±0.2*	3.4±0.3
		軟骨ひらん		3.0±0.0	2.5±0.2*	2.5±0.3
		粗造化/亀裂		3.0±0.0	2.5±0.2*	3.0±0.3
		プロテオグリカン染色性低下		3.3±0.2	2.6±0.2*	3.4±0.3*
		軟骨細胞配列不整		3.6±0.2	3.0±0.3	3.4±0.3
		軟骨細胞消失		3.4±0.2	3.0±0.2	3.4±0.3
		軟骨下骨露出		0.0±0.0	0.3±0.2	0.1±0.1
		房状集簇形成		3.0±0.0	3.0±0.0	3.4±0.2
		総合組織学的評点(総合評点)		23.1±0.5	20.0±1.1	22.5±1.6
		サフラニンO不染領域の幅†		58.8±1.0	50.1±3.5*	52.0±5.3

各値は平均±標準誤差を示す。

†×20でのマイクロメータ目盛数(20目盛=1mm)

\* : p<0.05, \*\* : p<0.01, 対照群と比較して有意差あり(Mann-WhitneyのU検定, †はt検定)

# : p<0.05, SVE投与群と比較して有意差あり(Mann-WhitneyのU検定)

は関節内での滞留時間が長いことから、非架橋型HAに比較して疼痛軽減効果の持続が期待されているが、今回の実験結果からは、たとえ滞留期間内であっても投与を中止した時点から次第に疼痛抑制効果が減弱する可能性が示唆された。

Hylan G-F20は関節内投与後関節内に長期間(28日以上)滞留し、関節内の滑膜組織、軟骨組織への移行速度はきわめて遅いと報告されている。しかし、長期間関節内に滞留するとしても28日間で、膝OA患者における6か月にわたる長期間の作用持続は十分説明しえない。Hylan G-F20以外の270万HAを含む分子量が異なる非架橋型HA製剤では、関節内投与後関節潤滑作用および衝撃緩和作用により膝OA患者の関節疼痛軽減を行うとともに、変性軟骨組織、滑膜組

織に浸透し<sup>19), 29)</sup>、軟骨細胞および滑膜細胞に直接作用することにより、軟骨変性の抑制および二次性の滑膜炎・疼痛の制御に働いていると想定されており<sup>11), 30)~35)</sup>、その結果、関節液から消失後も長期間の疼痛軽減効果の持続が可能であると考えられている。

関節軟骨の変性に対する効果については、肉眼的傷害面積では、対照群と比較し、270万HA投与群では大腿骨で凹部の有意な低値、脛骨で白色粗造部の低値傾向と凹部の有意な低値、すなわち有意な傷害面積の減少が認められた。

この軟骨変性抑制効果は、すでに三原らが報告した結果と一致している<sup>11), 36)</sup>。

一方、Hylan G-F20投与群では対照群と比較し有意な差は認められなかった。