

(免疫組織化学)と現在産生している細胞の分布 (ISH) は異なってくる (図 1)。ISH で使うプローブの種類については、二本鎖 cDNA, 一本鎖 DNA, 合成オリゴヌクレオチド、一本鎖 RNA などがある。それぞれに特徴があるが、入手可能であれば一本鎖 RNA が理想的である。最近では、核酸の塩基配列をインターネットなどで検索できるので、オリゴプローブも合成可能である。プローブの標識については、現在はジヨキゲニンなどの非放射性物質による標識が多く用いられている。実際の ISH の手順については成書を参照されたい<sup>2)</sup>。おおまかに述べると、脱パラフィン、ハイブリダイゼーション前の前処理、ハイブリダイゼーション、洗い、そしてシグナルを可視化するための発色反応である。

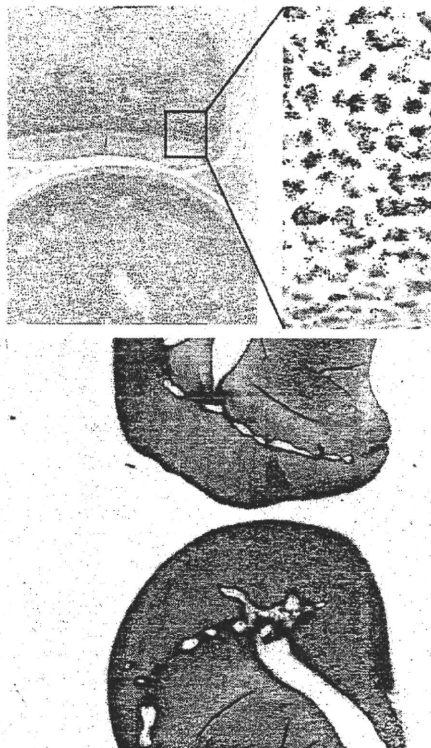


図 1：ニフトリ鼠の膈筋組織での II 型コラーゲンの蛋白と mRNA の分布  
蛋白 (左) の陽性範囲は軟骨基質全体であるのに対して、mRNA (右) は軟骨細胞のみが陽性となる。

7) MicroProbe Staining System  
最近、筆者らは MicroProbe Staining System (Fisher Scientific 社, USA) を用いて ISH をおこなっている。反応の流れは通常の ISH とだいたい同じであるが、手順がかなり簡略化され、ハイブリダイゼーションの時間が30分～2時間

となり、実験全体が2～3時間で終了できる。一般の ISH 法ではハイブリダイゼーション時間は12～18時間で、切片がはがれやすいが、このシステムでは標本がはがれることは少ない。この方法は毛細管現象を利用して反応液を吸い上げたり、排出したりするシステムで、スライドガラスの上側と下側の角の部分にセラミクス塗料が塗装されている。このスライドガラスを2枚向かい合わせると、セラミクス塗料の厚みで150 $\mu$ m の隙間ができる (図 2)。反応液はこの隙間を毛細管現象で上がり、必要な量のプローブ液が切片を覆うようになっている。これをインキュベーター (反応槽) に入れて反応させる。

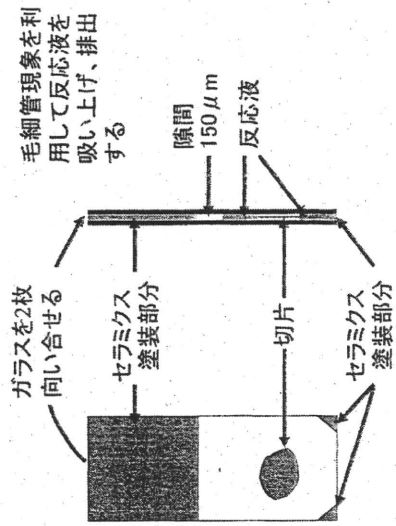


図 2：MicroProbe Staining System の原理  
このシステムでは毛細管現象を利用して反応液を切片上に載せている。

## 2. 肺動脈を用いた検討

### 1) 肺動脈研究について

大動脈は加齢とともに硬化性変化が進行するが、動脈硬化を促進させる因子としては加齢の他に高血圧、糖尿病、高脂血症などが挙げられる。しかし、肺動脈では肺高血圧症以外に高度の硬化性病変をみることは少なく、加齢に伴う肺動脈の変化については、簡単な問題ではないものと思われる。  
大循環系での血圧の上昇が大動脈硬化の大きな原因の一つであるとす

ば、血圧上昇のみられない肺動脈では、大動脈に比較して血圧の影響を無視した純粋な加齢的变化を把握しやすいのではないかと思われ、検討を行った。

## 2) 検討の対象

0～90歳までの剖検症例を対象に、肺動脈が左右に分岐する直前の部分を輪切りにして切り出した。この部分の肺動脈は大動脈に相当する弾性型の太い動脈部分である。症例の選択については、明らかな肺高血圧症の症例や肺動脈幹を巻き込む肺癆の症例を除いては特に制限を設けなかった。採取された検体は4% Paraformaldehyde / PBS で2～3時間、室温で固定し、通常のパラフィン包埋標本を作成した。ブロックは2μmに薄切、乾燥したものを脱パラフィン後に組織染色に用いた。

## 3) 方法

免疫組織化学および古典的な特殊染色によって、肺動脈の構成成分である、弾性線維、平滑筋線維、膠原線維について加齢的な変化を検討した。

血管の構成成分を染め分ける染色法として、Elastica Goldner (E-G) 染色やElastica van Gieson などの染色法がある。いずれも、免疫染色や精密な分析法が開発される以前からの方法であるが、現在もなお利用されている。今回は、E-G染色と抗体を用い、動脈の主要な構成成分の蛋白の同定をおこない、画像解析装置 Image Processor for Analytical Pathology-WIN (IPAP-WIN、住化テクスナービス株式会社) を用いて上記の成分の加齢的な変化を組織定量的に検討した。

## 4) 免疫染色とE-G染色との比較

はじめに連続切片を作成し、E-G染色と免疫染色の両方を行い、血管中膜における弾性線維、平滑筋線維、膠原線維、それぞれの分布状態を確認した。次に、同一視野でのE-G染色のレゾルシン-ブクシンと抗トロポエラスチン抗体の陽

性部位、オレンジGと抗平滑筋抗体陽性部位、ライトグリーンと抗I型コラーゲン抗体陽性の面積を画像解析装置 (IPAP-WIN) で測定し比較した (図3)。その結果、免疫染色とE-G染色の間では弾性線維は  $r=0.82$ 、平滑筋線維は  $r=0.96$ 、膠原線維は  $r=0.73$  といずれも高い正の相関が得られ、E-G染色の各成分が免疫染色での弾性線維、平滑筋線維、膠原線維をそれぞれ表すことが明らかになった (図4)。E-G染色は古くからの方法であり、検体の固定条件などにはあまり影響を受けない。E-G染色と免疫染色の結果の間に相関が得られない場合は、免疫組織化学のために試料を新たに収集しなければならないが、良好な相関が得られると、これまでに蓄積してあるパラフィンブロックが利用でき、過去の症例の検討が可能となる。

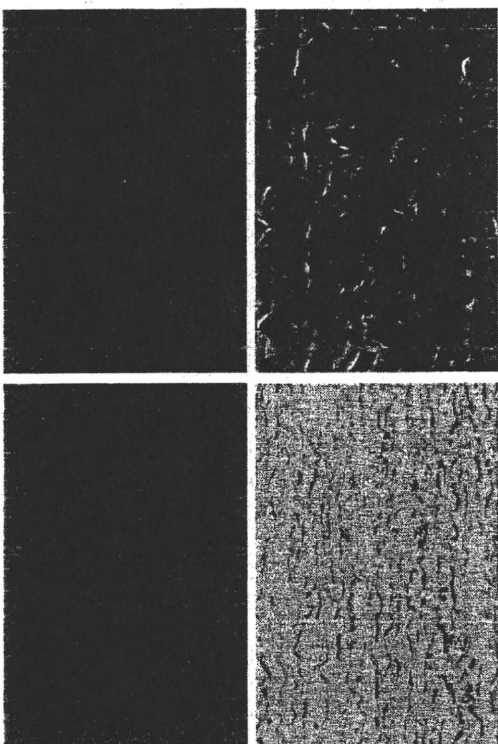


図3 : Elastica Goldner 染色と免疫染色の比較  
Elastica Goldner 染色で青色に染色される弾性線維 (左) と抗トロポエラスチン抗体で陽性 (茶かつ色) となる成分 (右)。それぞれの下段は画像解析装置での解析画像。

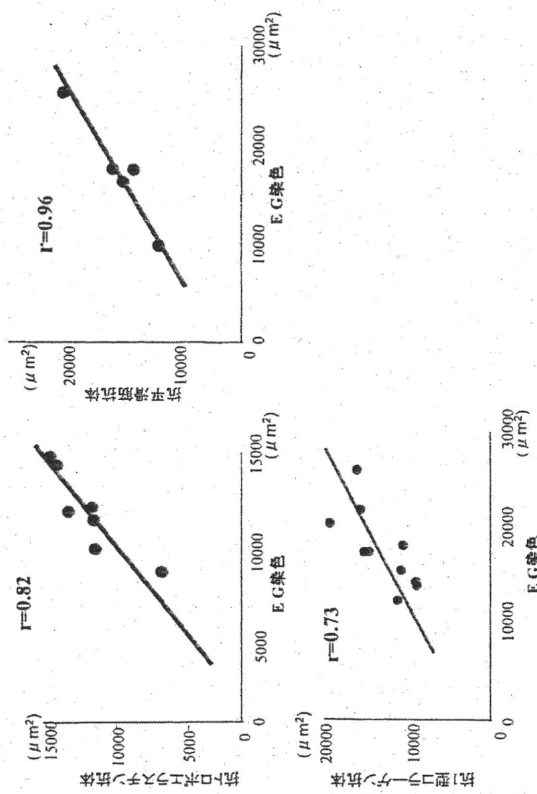


図4：Elastica Goldner 染色と免疫染色の面積の比較  
Elastica Goldner 染色での弾性線維、平滑筋線維、膠原線維の各成分と免疫染色のトロポエラスチン、平滑筋アクチン、I型コラーゲンの面積を比較した。いずれもR=0.7以上の正の相関を示す。

### 5) 肺動脈中膜の単位面積あたりの加齢的变化

上記の方法で肺動脈の各成分の加齢変化を計測した結果、興味深い所見が得られた。単位面積あたりの値で見ると、加齢に伴って膠原線維は増加するものの、弾性線維と平滑筋線維は減少していく傾向にあった(図5)。この所見は大動脈壁における加齢変化としてすでに報告されている結果<sup>7) 8)</sup>と類似している。

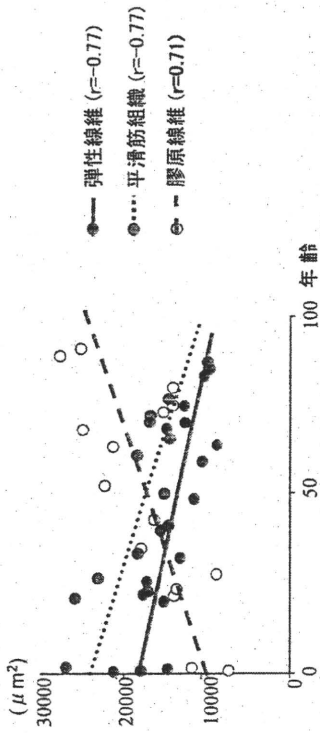


図5：単位面積当たりの肺動脈各成分の加齢变化  
加齢とともに、膠原線維は増加するが、弾性線維と平滑筋線維は減少する。

### 6) 肺動脈中膜の剖断面全体における加齢的变化

次に、血管の剖断面での中膜の面積全体を測定し、各成分の総面積を求めた。その結果、肺動脈の中膜の断面面積は加齢とともに増加し(図6)、血管の直径も大きくなっていった。個々の成分については、膠原線維は加齢とともに増加し、弾性線維や平滑筋線維も少くも増加している(図7)。しかし、その増加の割合が膠原線維では非常に大きいものに対して、弾性線維や平滑筋線維はゆっくりに減少しているため、相対的には減少していくようにみえるということが明らかとなった。

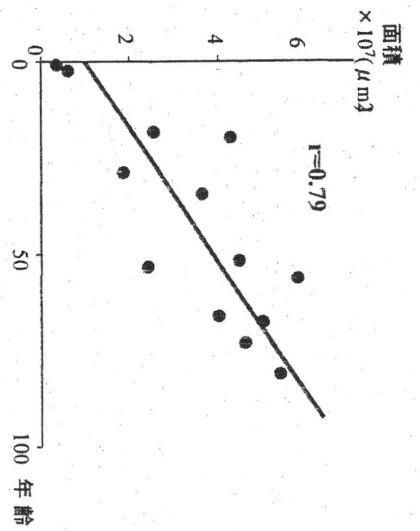


図6：肺動脈中膜の面積の加齢変化  
加齢とともに肺動脈の中膜の横断面の面積は増加する。

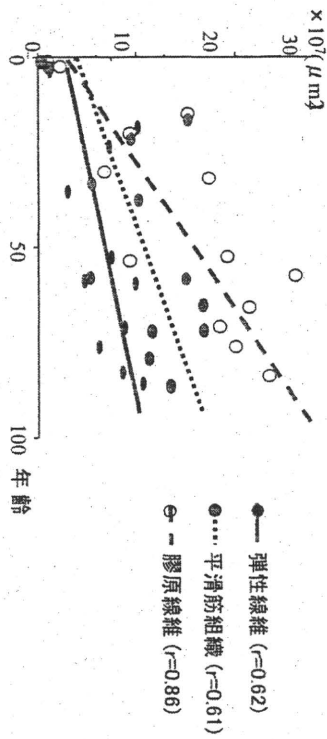


図7：肺動脈の各成分の加齢変化  
肺動脈の横断面において、膠原線維、弾性線維、平滑筋線維いずれも加齢とともに増加するが、膠原線維に比較して弾性線維や平滑筋線維の増加はゆるやかである。

### 7) 肺動脈中膜の内膜側、外膜側での比較

さらに肺動脈の中膜を内膜から外膜に向かって3等分し、それぞれの領域について弾性線維・平滑筋線維・膠原線維の面積を測定した。その結果、各成分の面積の比率は内膜側の中膜では、弾性線維：平滑筋線維：膠原線維=20：23：

28であるのに対し、外膜側では22：25：26であり、内膜側で膠原線維の比率が増加していた。

### 8) 肺動脈中膜の変性を引き起こす要因

中膜の変性の原因としては、最近注目されているアポトーシス<sup>9)10)</sup>の他に、エラスターゼをはじめとする蛋白分解酵素を発現する顆粒球系細胞<sup>11)</sup>やマクロファージ<sup>12)13)</sup>などがあげられる。さらに血漿成分の血管壁への染み込みも考えられる。そこで、顆粒球、アポトーシス陽性細胞、エラスターゼ陽性細胞の数を検討したところ、中膜の内膜側が外膜側に比べて多かった(表1)。また血漿成分を代表するアルブミンの染み込みについても内膜側のほうが明らかに高度であった。ヒトの寿命は70～80年と長い。悪性腫瘍や破壊性疾患のようにペルデアポトーシスや蛋白分解酵素などの血管の障害因子が多量に発現したら、ヒトはあっという間に死んでしまう。したがって、肺動脈ではゆっくりではあるものの、加齢とともに弾性線維や平滑筋線維の変性は進行しており、代わって膠原線維の増加が起きているといえる。

	LCA (個数)	エラスターゼ (個数)	アポトーシス (個数)	CD68 (μm <sup>2</sup> )
内膜側	1.65±0.7	0.28±0.19	25±6.5	550±289
外膜側	0.67±0.7	0.16±0.17	17.9±5.1	628±484

表1：肺動脈におけるアポトーシスや炎症性細胞数  
好中球(LCA: leucocyte common antigen)、エラスターゼ、アポトーシス陽性細胞は中膜の内膜側の方が外膜側よりも陽性細胞数が多い。

### 参考文献

- 澤井高志、宇月美和、高橋裕一、宮崎修吉、斎藤隆幸、井上敏子：パラフィン切片を用いたサイトカインの免疫染色学的方法。病理と臨床 10:1067-1070, 1992.

- 2) 澤井高志、宇月美和：ラジオアイソトープ (RI) を用いた *in situ* hybridization (ISH) の実践と応用。組織細胞化学 1995 (日本組織細胞化学会編), pp132-138. 1995 学際企画, 東京
- 3) 井上尚美、宇月美和、森山芳則、安藤紀昭、佐藤克巳、小島忠士、鈴木勝己、澤井高志：慢性関節リウマチ (RA) 関節破壊に関与する酸性プロテアーゼ (Cathepsin D) の活性化機構に関する免疫組織化学的解析。炎症 15: 313-321. 1995.
- 4) 松本不二夫、宇月美和、金子智香、力丸陽、国分正一、澤井高志：急速破壊型関節症 (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.
- 5) 森士朗、手島貞一、澤井高志、京極方久：硬組織に対するモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学的染色のための脱灰法の開発。病理と臨床 4: 667-670. 1986.
- 6) 森士朗：硬組織免疫組織化学のための脱灰法。組織細胞化学 1990 (日本組織細胞化学会編), pp 83-91. 1990. 学際企画, 東京.
- 7) 矢野広志：人大動脈中膜の加齢的変化。久留米医誌 36: 1042-1095. 1973.
- 8) 坂本寛志：細胞外マトリックスの加齢的変化。現代医療 23: 2365-2370. 1998.
- 9) Smith JD, McLean SD, Nakayama DK: Nitric oxide causes apoptosis in pulmonary vascular smooth muscle cells. Journal of Surgical Research 79: 121-127. 1998.
- 10) Hishikawa K, Oemar BS, Tanner FC, Nakai T, Fujii T, Luscher TF: Overexpression of connective tissue growth factor gene induces apoptosis in human aortic smooth muscle cells. Circulation 100: 2108-2112. 1999.
- 11) Reape TJ, Groot PH: Chemokines and atherosclerosis. Atherosclerosis 147: 213-225. 1999.
- 12) Ohtsuki K, Hayase M, Akashi K, Koyiwada S, Strauss HW: Detection of monocyte chemoattractant protein-1 receptor expression in experimental atherosclerotic lesions: an autoradiographic study. Circulation 104: 203-208. 2001.
- 13) Kinard F, Jaworski, Sergeant-Engelen T, Goldstein D, Van Veldhoven PP, Holvoet P, Troutet A, Schneider YJ, Remacle C: Smooth muscle cells influence monocyte response to LDL as well as their adhesion and transmigration in a coculture model of the arterial wall. Journal of Vascular Research 38: 479-491. 2001.

### 3. 加齢および肺高血圧症に伴う肺動脈幹の変化 —組織計測を用いた解析—

鎌滝章史<sup>1</sup>、宇月美和<sup>1</sup>、佐々木信人<sup>1,2</sup>、澤井高志<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 岩手医科大学 病理学第一講座

<sup>2</sup> 岩手医科大学 内科学第三講座

はじめに

肺の血管病変という肺高血圧症や膠原病に伴う plexiform lesion や線維性の内膜肥厚、フィブリノイド血管炎など中小動脈にみられる固有の血管病変が連想され、いわゆる“硬化性病変”についてはあまり関心が払われてこなかった。平均血圧10 mmHg と大動脈と異なり血圧も低い環境ではそれほど目立った変化がみられないことも事実である。しかし、肺動脈といえども生体であり、加齢に伴い変化が進行していくことが予測される。また、肺高血圧症の場合でも、変化の顕著な中小動脈の血管だけでなく、大きな血管もならんからの影響を受けていることが考えられる。

本研究では、組織計測を用いて肺動脈幹を構成する成分である弾性線維、膠原線維、平滑筋線維について、初めに加齢に伴う変化を検討し<sup>(1)</sup>、次に膠原病に伴う肺高血圧症の場合について検討した。

#### 1. 検索の対象および方法

検索の対象：

加齢による変化：0才から90才までの15症例で、いずれも心疾患および心臓に慢性的な影響を与える肺、およびその他の疾患のない剖検症例である。

肺高血圧症：肺高血圧症 (PH) の膠原病、原発性肺高血圧症 (PPH) の剖検症例、計10例であり、心奇形による肺高血圧症は含まれていない。

計測部位：組織計測の部位は右の心室から出てすぐの左右の肺動脈に分岐する

部位である。縦軸に垂直（輪切り）切りホルマリンで固定後、パラフィンに包埋した後薄切して用いた。

一般染色：ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、エラスチカゴールブナー (EG) 染色、アルリアンブルー (Al-blue) 染色をおこなった。

免疫染色：免疫染色は対象とする弾性線維、平滑筋線維、膠原線維に合わせて、抗エラスチン抗体、抗平滑筋抗体、抗コラーゲンI型抗体をもちいた。免疫染色の方法は通常行われている ABC 法 DAB 発色によった。

計測：EG 染色の弾性線維（エラスチカ）、平滑筋線維（ボソナー）、膠原線維（ゾリーソン）を病理画像解析システム (Image processor for analytical pathology, IPAP) を用いて、測定した。解析時の、それぞれの線維を異なる色で表した像を Fig. 1 に示す。次に免疫染色による弾性線維、平滑筋線維、膠原線維の DAB 発色をそれぞれ計測した。そして、EG 染色と免疫染色によるそれぞれの成分の測定結果を比較し、線維成分や間質成分をみることに利用されてきた EG 染色が真にそれぞれの成分を表現できているのか検討した。EG 染色が成分を正しく表現できているのであれば、パラフィンブロックの形で保存している免疫染色に適さない古い症例でも解析に用いることができるため、保存ブロックが有用であることも証明される。

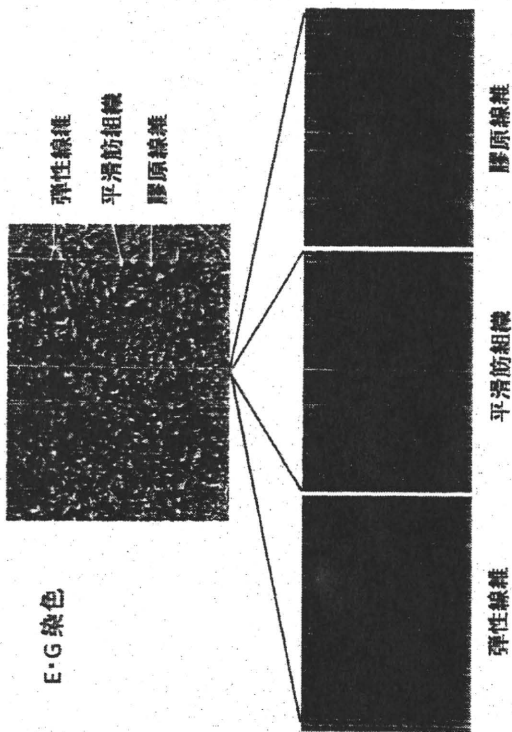


Fig. 1 画像解析システムによる解析像一つの像を、弾性線維(赤)、平滑筋線維(青)、膠原線維(緑)に分離して解析した。

## 2. 結果

### 1) EG染色と免疫染色の相関

Fig. 2 に弾性線維、平滑筋線維、膠原線維のEG染色と免疫染色の像を、さらにそれぞれを比較したグラフをFig. 3に示した。いずれも $r=0.82, 0.96, 0.73$ と有意の相関を示した。これにより保存してあるパラフィンブロックでもEG染色をすることにより弾性線維、平滑筋線維、膠原線維を定量化して比較することが可能であることが証明された。

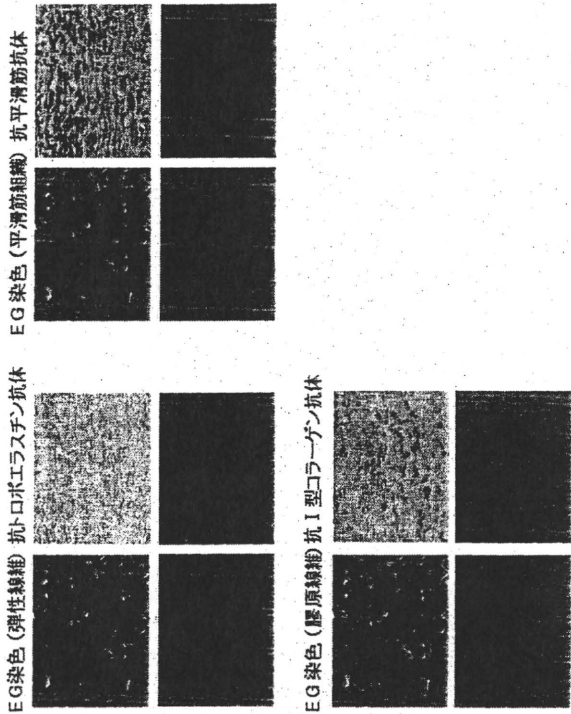


Fig. 2 EG染色と免疫染色の像の比較。EG染色の像と抗エラスチン抗体、抗平滑筋抗体、抗コラーゲンI抗体を用いた免疫染色の像を比較した。明視野の像の下の写真で、それぞれの線維の部分を赤で示している。

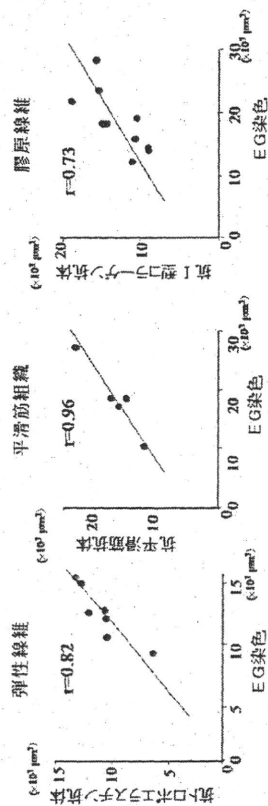


Fig. 3 EG染色と免疫染色から測定した線維の面積の比較。EG染色と免疫染色で得られた線維の面積を比較した結果、弾性線維、平滑筋線維、膠原線維いずれも高い相関を示した。

## 2) 加齢による変化と内膜、外膜側の比較

### I. 加齢による変化

パラフィンブロックから切片を薄切してEG染色を行い、IPAPでその面積を測定した。加齢とともに弾性線維は、 $r = -0.77$ と減少し、平滑筋線維も  $r = -0.77$ と減少した。一方、膠原線維は  $r = 0.71$ と加齢とともに増加していることが証明された (Fig. 4)。

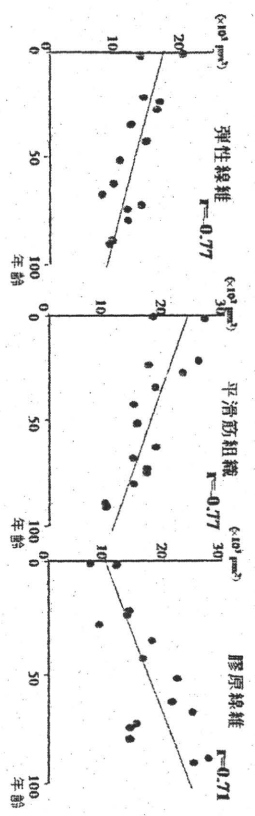


Fig. 4 加齢に伴う肺動脈の線維成分の変化  
0-90歳の15例で、加齢に伴う線維の変化をIPAPによって解析した。  
弾性線維と平滑筋線維は加齢に伴い減少していたが、膠原線維は増加していた。

### II. 肺動脈中膜の内膜側と外膜側の比較

壁を厚さで三等分し、その一番内側の内膜側と一番外側の外膜側を比較した。その結果、内膜側のほうが外膜側より弾性線維と平滑筋線維の減少や膠原線維の増加が強く起こっていることが証明された。

### III. 内膜側と外膜側の変化を引き起こすパラメータの比較

内膜側と外膜側の差が如何なる原因で引き起こされるかを明らかにするために、白血球、マクローラージ、エラスターゼ陽性細胞、アポトーンスを、抗ICA抗体、抗CD68抗体、抗エラスターゼ抗体、TUNNEL法を用いて、それぞれ解析した。その結果、肺動脈の内膜側では外膜側に比較して炎症性細胞、エラスターゼ陽

性細胞、アポトーンスの増加などがみられたがCD68陽性のマクローラージはほぼ同じで差がないことが明らかになった。また、定量化はおこなっていないものの、抗アルブミン抗体で染色した結果、内膜側のほうが外膜側に比較して血漿成分のしみ込んでいることが証明されたが、これが原因なのか、結果なのかは不明である。

以上の結果より、肺動脈でも加齢とともに変化が起こっており、壁の構成成分から見ると弾性線維と平滑筋線維は減少し、膠原線維は増加することが明らかになった。

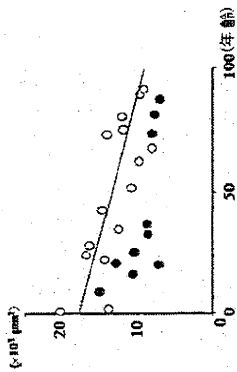
### 3) 肺高血圧

肺高血圧症例についても同様に剖検症例10例に対してEG染色を施行し、IPAPで計測して比較した。その結果、

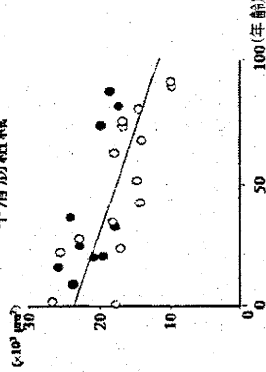
- 1) 肺高血圧症の症例では加齢に対して弾性線維の著明な減少が認められた。
- 2) 膠原線維は若年者で高い傾向を示し、平均的にもやや高い値を示した。
- 3) 一方、平滑筋組織の面積は加齢的变化からみて減少の傾向はなかった。
- 4) 平滑筋細胞の核数は、加齢的变化に対して変化せず、ほぼ一定の数を示した。
- 5) また、平滑筋/核、つまり胞体の平均面積も加齢に対しても変化せず、ほぼ一定の値を示した (Fig. 5)。



弾性線維



平滑筋組織



膠原線維

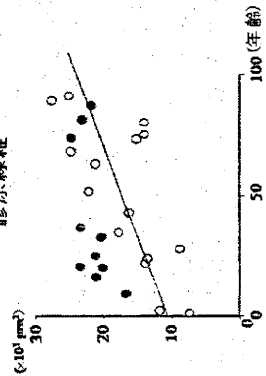


Fig. 5 肺高血圧症に伴う肺動脈の線維成分の変化  
10例の肺高血圧症の患者の肺動脈の線維成分をIPAPによって解析した。  
正常の加齢変化とは異なり弾性線維は顕著に減少しており、膠原線維はや  
や高い値を示した。

肺高血圧症の肺動脈中膜は正常の加齢的变化とは異なる態度を示した。弾性線維は加齢変化のように減少していたが、膠原線維は加齢にともなう増加が認められるものの若い年代の剖検症例でも増加していた。また、平滑筋組織の面積は加齢とともに減少していたが、肺高血圧症の場合は加齢に伴う減少傾向はみられず、全体の面積を核の数で割った平均の細胞面積（容積）も、一定の傾向を示した。

3. 考 察

ヒトの大動脈の場合、一般には加齢とともに動脈硬化が進展し、高度になると内膜の肥厚、弾性線維の断裂、平滑筋の萎縮、アテロームの形成、石灰沈着

などが起こり、さらに高度になると動脈瘤の形成や解離性の変化を引き起こす。その原因としては高血圧、糖尿病、高コレステロール血症あるいは最近では喫煙などもあげられ、メタボリックシンドロームとして大きな社会問題にもなっている<sup>(2)</sup>。

肺動脈幹の場合は肺高血圧症や高コレステロール血症などで内膜の肥厚が起こることが知られているが<sup>(3)</sup>、肺実質における中小の肺動脈と違い、あまり大きな障害と関連した変化は指摘されてきてない。しかし、今回の結果は、サイズの大きい肺動脈幹でも加齢や肺高血圧症とともに壁を構成する成分に変化が起こっていることを示している。組織学的には、弾性型動脈である太い肺動脈幹においては、弾性線維と平滑筋線維の断裂や消失による量的減少、膠原線維の増加という結果が得られた。また、壁の内外を比較すると内膜側が外膜側よりも変化がより顕著であり、そこに関連する因子として、白血球、エラストーゼ陽性細胞、アポトシス陽性細胞が外膜側に比較して内膜側で多く認められた。また、抗体を用いて検討した結果、内膜側では外膜側に比較し、アルブミンの染み込みがより目立つという結果が得られた（データ提示せず）。

Wagenvoort からも正常の肺動脈幹では加齢とともに弾性線維は減少し、膠原線維に置き換えられ、その結果、壁全体の弾力性が減少すると報告している<sup>(4)</sup>。中膜については、加齢とともに筋線維の配列は不規則になるもの大きな変化はないと報告しており、今回の結果と異なるが、この違いは我々が計測の対象について中膜を構成する平滑筋に絞って定量化しているのに対し、彼らは中膜全体としての層の厚さを問題にしているためではないかと思われる。一般的に肺動脈幹を構成する成分のなかで肺高血圧症においても目立つのは内膜の肥厚であるが、これは、結果としてみられるものの大動脈に比較して軽度であり、粥状硬化のような激しい変化まで至るものはない。

肺高血圧症における中小の肺動脈を対象とした変化についての報告は多いものの肺動脈幹あるいは太い肺動脈の壁を構成する成分についての解析は少なく、1960-1970年代の Wagenvoort らの報告が中心である。肺動脈幹の変化は全身に

与える影響は少ないものの、成分に対する抗体やプロークを用いた解析が可能になった現在、弾性線維や膠原線維の再生とこれを産生する責任細胞、あるいは平滑筋細胞の活性について、さらには破壊の面でもこれらの線維を分解する酵素やその動態についての把握が可能かもしれない。

肺動脈幹の加齢に伴う変化は弾性線維と平滑筋線維の減少と膠原線維の増加である。弾性線維は加齢とともに減少するという傾向は動物などでも観察されており、そのなかでもっとも重要な因子としてエラスターゼの活性化があげられているものの<sup>(5)</sup>、活性の亢進の理由についてはあきらかにされてない。好中球エラスターゼは平滑筋細胞も産生するという吉田らの報告もあり<sup>(6)</sup>、また MMP12<sup>(7)</sup> や、その他の MMP の発現も証明されていることから<sup>(8)</sup>、平滑筋細胞の動態については phenotype modulation として secretory form としての蛋白の合成や spindle form としての収縮の変換だけの問題だけではなく、蛋白分解酵素の発現の面からも興味のもたれる現象である。

膠原病の肺高血圧症や原発性肺高血圧症を検討した結果、弾性線維の減少、平滑筋線維の一定化の傾向がみとめられた。一般に肺高血圧症の変化として太い血管に目立つのは内膜の肥厚である。この変化については、内皮細胞の障害、弾性板の変化、平滑筋細胞の活性化と遊走、spindle form から secretory form への形質変換など大動脈と同じ機構が作用しているものと思われる。今回は、加齢における動態を対照としたが、肺高血圧症の原因となる基礎疾患、膠原病の種類、程度、血圧の程度、罹病期間など本来、検討すべきパラメータは数多く、今後、検討していく必要がある。

また、弾性線維、平滑筋線維、膠原線維では、それぞれが血管構築において、その役割も異なるため環境の変化に対する反応の仕方も異なる可能性がある。平滑筋は、肺高血圧症例でも減少傾向がみられず、むしろこの平滑筋線維の増大が中膜を肥厚させて肺高血圧症をさらに亢進させるともいわれている。エラスターゼの発現によりエラスチンの分解が亢進するため、これを補う形で平滑筋が発達するという実験結果もあり<sup>(9)</sup>、この結果は、エラスターゼの活性を抑

制し、エラスチン分解を抑えると平滑筋の発達も起こらず肺高血圧症の亢進を抑えることができるという治療に繋がるものである。また、エラスターゼの活性抑制は弾性線維の消失を防ぐため平滑筋の遊走を抑えるという報告もある<sup>(10)</sup>。これらの結果が、肺動脈の太い部位に起こる現象に関連するかは不明であるが、弾性線維と平滑筋線維の関係は、血管の弾性作用に関連する機能をもつものとして面白い。最近の報告では、高血圧症などのように圧負荷が亢進すると、細胞内の Rho が活性化され、細胞の増殖が起こるとされているが<sup>(11)</sup>、*in vivo* において数の増加が実際に起こっているかどうかは疑問であり、我々の結果も単に全体の容積を核の数で割った値であるが、一つの核当たりの細胞の容積はほぼ一定であり、数的に増加するという結果は得られていない。これは、肺高血圧という適度な刺激が絶えず平滑筋細胞に与えられるため増加もしない代わりに正常でみられる萎縮という現象が起こらないのではないかとも思われる。

大動脈の障害因子については、前述のごとく、高血圧<sup>(12)</sup>、酸化 LDL<sup>(13)</sup>、好中球エラスターゼ<sup>(14)</sup>、マクロファージから放出される MMP-2、-9<sup>(15)</sup>、NO の作用<sup>(16)</sup>、フリーラジカル<sup>(17)</sup>、さらに HSP<sup>(18)</sup> などの面から検討されており、肺動脈においても今後の検討課題である。

### 参考文献

1. 宇月美和, 岩崎真弓, 伊藤吉賢, 大内修二, 及川真一, 澤井高志. 画像解析による肺動脈幹中膜の加齢学的変化. 脈管学 2003;43:659-666.
2. von Eckardstein A. Risk factors for atherosclerotic vascular disease. *Handb Exp Pharmacol* 2005;170:71-105.
3. Nityanand S, Roy AK, Zaidi SH, Singh GB. Experimental pulmonary embolism and pulmonary arteriosclerosis: effect of hypercholesterolemia. *Indian J Med Res* 1965;53:849-54.
4. Wagenvoort CA, Wagenvoort N. Age changes in muscular pulmonary arteries. *Arch Pathol* 1965;79:524-8.

5. Robert L, Jacob MP, Frances C, Godeau G, Hornebeck W. Interaction between elastin and elastases and its role in the aging of the arterial wall, skin and other connective tissues. A review. *Mech Ageing Dev* 1984;28:155-66.
6. Yoshida Y, Mitsumata M, Ling G, Jiang J, Shu Q. Migration of medial smooth muscle cells to the intima after balloon injury. *Ann N Y Acad Sci* 1997;811:459-70.
7. Wu L, Tanimoto A, Murata Y, Sasaguri T, Fan J, Sasaguri Y, et al. Matrix metalloproteinase-12 gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Genes Cells* 2003; 8 :225-34.
8. Okada Y, Katsuda S, Nakanishi I. An elastolytic enzyme detected in the culture medium of human arterial smooth muscle cells. *Cell Biol Int* 1993; 17:863-9.
9. Ilkiw R, Todorovich-Hunter L, Maruyama K, Shin J, Rabinovitch M. SC-39026, a serine elastase inhibitor, prevents muscularization of peripheral arteries, suggesting a mechanism of monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Circ Res* 1989;64:814-25.
10. Ye CL, Rabinovitch M. Inhibition of elastolysis by SC-37698 reduces development and progression of monocrotaline pulmonary hypertension. *Am J Physiol* 1991;261:H1255-67.
11. Seasholtz TM, Majumdar M, Kaplan DD, Brown JH. Rho and Rho kinase mediate thrombin-stimulated vascular smooth muscle cell DNA synthesis and migration. *Circ Res* 1999;84:1186-93.
12. Frohlich ED, Susic D. Blood pressure, large arteries and atherosclerosis. *Adv Cardiol* 2007;44:117-24.
13. Galle J, Hansen-Hagge T, Wanner C, Seibold S. Impact of oxidized low density lipoprotein on vascular cells. *Atherosclerosis* 2006;185:219-26.
14. Dollery CM, Owen CA, Sukhova GK, Krettek A, Shapiro SD, Libby P. Neutrophil elastase in human atherosclerotic plaques: production by macrophages. *Circulation* 2003;107:2829-36.
15. Deguchi JO, Aikawa M, Tung CH, Aikawa E, Kim DE, Ntziachristos V, et al. Inflammation in atherosclerosis: visualizing matrix metalloproteinase action in macrophages in vivo. *Circulation* 2006;114:55-62.
16. Napoli C, de Nigris F, Williams-Ignarro S, Pignalosa O, Sica V, Ignarro LJ. Nitric oxide and atherosclerosis: an update. *Nitric Oxide* 2006;15:265-79.
17. Yung LM, Leung FP, Yao X, Chen ZY, Huang Y. Reactive oxygen species in vascular wall. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2006; 6 : 1-19.
18. Mehta TA, Greenman J, Ettelaie C, Venkatasubramanian A, Chetter IC, McCollum PT. Heat shock proteins in vascular disease--a review. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2005;29:395-402.

最新医学・別冊 新しい診断と治療のABC 8 (別刷)

免疫1 関節リウマチ

病理 —滑膜の炎症から骨破壊まで—

澤井高志 宇月美和  
佐々木喜子 金 仁順

最新医学社

## 第2章 病理・病態生理

## 病 理 —滑膜の炎症から骨破壊まで—

## 要 旨

関節リウマチは免疫異常を背景とした全身性の疾患であるが、その標的臓器は主に関節であり、病理組織学的な特徴として滑膜細胞の増殖、血管の新生、炎症性細胞の浸潤、軟骨・骨破壊などが挙げられる。ここでは滑膜に始まる炎症から軟骨・骨破壊に至る過程を病理組織学的な見地から説明し、それぞれの stage や病変部に見られる細胞とその機能、さらに病変形成に関する因子について述べた。

## はじめに

関節リウマチ (RA) は免疫異常を基礎とする全身性の炎症性疾患であるが、その標的臓器は主として関節であり、関節での炎症が慢性に経過した結果、軟骨、骨の吸収さらには線維化に至り、臨床的には関節の屈曲、変形、高度の運動障害などが見られるようになる。RA の炎症は「滑膜に始まり関節に終わる」と言われるが、ここでは、関節の滑膜で始まった炎症がどのような過程を経て関節の破壊に至るかを最近の知見を加えながら病理組織学的に述べてみたい。

組織に関する記載はそれほど大きく変わるわけではないが、病態；治療に関する興味の変化とともに組織像への関心も変化する。例えば、5年前はマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) などのタンパク分解酵素が注目されており、我が国では腫瘍壊死因子 (TNF) $\alpha$  に対する生物学製剤が使われ始めた頃であったが、今やパラダイムシフトとも言うべき現象が起っている。したがって、現在の関心はサイトカインの動態のほうが大きいのではないと思われるが、ここでは RA の基本的な病理組織像を中心に説明する。

## ● キーワード

関節リウマチ  
病理組織学  
滑膜炎  
軟骨・骨破壊

### 滑膜の病理組織学

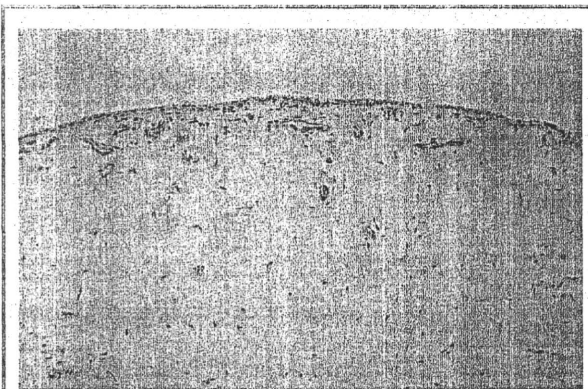
前述のごとく RA の炎症は滑膜に始まるが、初めに正常の滑膜組織について少し述べておきたい。正常の滑膜組織は、その名前が示すように非常に滑らかな膜である (図1)<sup>1)2)</sup>。組織学的にみるならば、滑膜表層細胞と言われる基底膜構造を持たない細胞が表層に1, 2個、浮いたような状態で存在し、そのもとには脂肪組織、さらにその外側に 関節包と呼ばれる関節を包む線維性の組織があり腱組織に移行する。

関節腔に面する滑膜の表層細胞はマクロファージ系細胞の滑膜A細胞と間葉系細胞の滑膜B細胞から成るが、いずれも非炎症下では細胞内の小器官はそれほど発達しているわけではない。滑膜細胞の起源については、完全に合意されているわけではないが、最表層は胸膜、腹膜と同様の中皮細胞由来、RA の進行とともに増えてくる細胞については骨髄にある単球系由来の細胞であるという見方が有力である<sup>3)</sup>。これらの表層細胞は上皮系細胞のような基底膜構造はなく、電子顕微鏡で観察すると一見ばらばらに表層に浮いているように見えるが、細胞間にはラミニンやフィブロネクチン、ヒアルロン酸などが組織学的に証明されており、ちょうど細胞間を埋める接着剤のような働きを成している<sup>4)</sup>。

一般に RA の炎症が始まるのは滑膜、軟骨、骨膜がお互いに移行するベアエリアと言われている部位からであるが、ここには、毛細血管

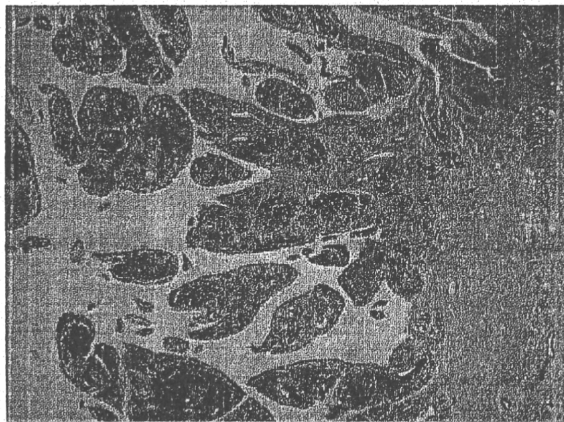
や未分化な間葉系細胞が存在し、血管も透過性が亢進しやすい有窓性の構造をとっている。しかし一方では、滑膜組織自身にも炎症反応は始まっており、最初に反応するのは Class II 陽性の紡錘形細胞であり、血管の周囲に現れる<sup>5)</sup>。次いで、T細胞の浸潤が見られるが、B細胞が現れるのは少し時間が経過してからである。最終的には、時間の経過につれて、T細胞、B細胞いずれの浸潤も見ら

図1 正常の滑膜組織



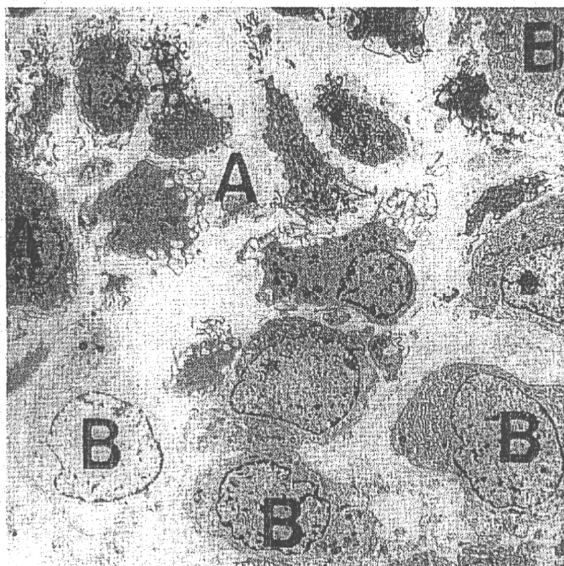
正常の滑膜の組織は名前の示す通り滑らかである。1ないし2層の表層細胞と脂肪組織から成る。

図2 関節リウマチ (RA) の滑膜組織



RA の滑膜組織は絨毛状で多彩な像を示す。表層細胞の多層化、リンパ球の浸潤、血管の新生が特徴である。

図3 滑膜表層の電顕像



関節リウマチ (RA) の滑膜表層ではマクロファージ型の滑膜A細胞、間葉系細胞型の滑膜B細胞、そして中間型を示す滑膜AB細胞が認められる。

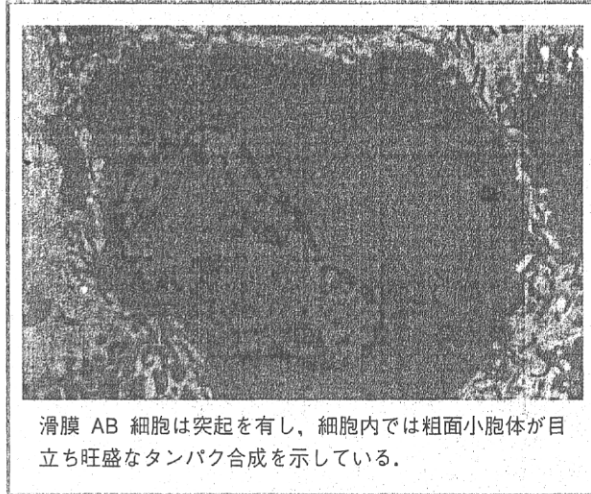
れるようになるが、サブセットとしては白血球分類用表面抗原 (CD)4 陽性のT細胞が優位であり、CD8 陽性T細胞の数は少ない。リウマチ因子はB細胞が集簇してから産生されるようになるため、病初期におけるリウマチ因子は骨髓やリンパ節などで産生されているものと思われる。炎症の最盛期でリンパ濾胞が形成されるようになると、滑膜組織にはCD3 陽性T細胞とB細胞が数のうえで優位となる。

#### 1. 滑膜表層近傍

炎症が高度になると滑膜組織は図1のような正常の滑らかな膜様構造から図2に見られるような絨毛状を呈するようになる。表層の細胞については、前述のごとくマクロファージ型の滑膜A細胞と間葉系細胞型の滑膜B細胞、そして両者の中間の性質を示す滑膜AB細胞の増加が目立ち、多層化して多いときには10層にも及ぶ(図3)。特に滑膜AB細胞は突起が発達している一方で胞体内の粗面小胞体も豊富であり、機能的には旺盛なタンパク合成を示唆している(図4)。これらの細胞は細胞外マトリックスの合成が盛んなだけではなく、サイトカインや増殖因子さらにはタンパク分解酵素などの産

生も亢進し<sup>6)</sup>、場合によっては同じ細胞がコラーゲンなどの基質を産生しつつ、MMPなどの分解酵素の産生を同時に示すこともある。図5に滑膜表層細胞で産生される主なタンパク分解酵素である MMP-

図4 滑膜 AB 細胞の電顕像



3 の メッセージ RNA (mRNA) と酵素タンパクを挙げたが、ここはタンパク産生の宝庫と言っても過言ではない<sup>7)</sup>。また、免疫学的機能からみると、この表層に見られる細胞はヒト白血球抗原 (HLA) -DR の発現が顕著である<sup>8)9)</sup>。ここで産生、分泌される上記のタンパクのほとんどが関節液中に放出されるため関節液ではこれらの濃度が高値になっている。

## 2. 滑膜深部の組織

表層細胞のやや下方に毛細血管網が発達し、ここから好中球、単球の浸潤が起ってくる。この好中球はインターロイキン (IL)-8 などの CXC ケモカインやマスト細胞特異的セリンプロテアーゼ (MCP)-1 やマクロファージ炎症性タンパク質 (MIP)-1 $\alpha$  などの CC ケモカインなど走化性を示す物質の影響を

図5 滑膜表層細胞に見られるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)-3 の発現 (タンパクと mRNA)

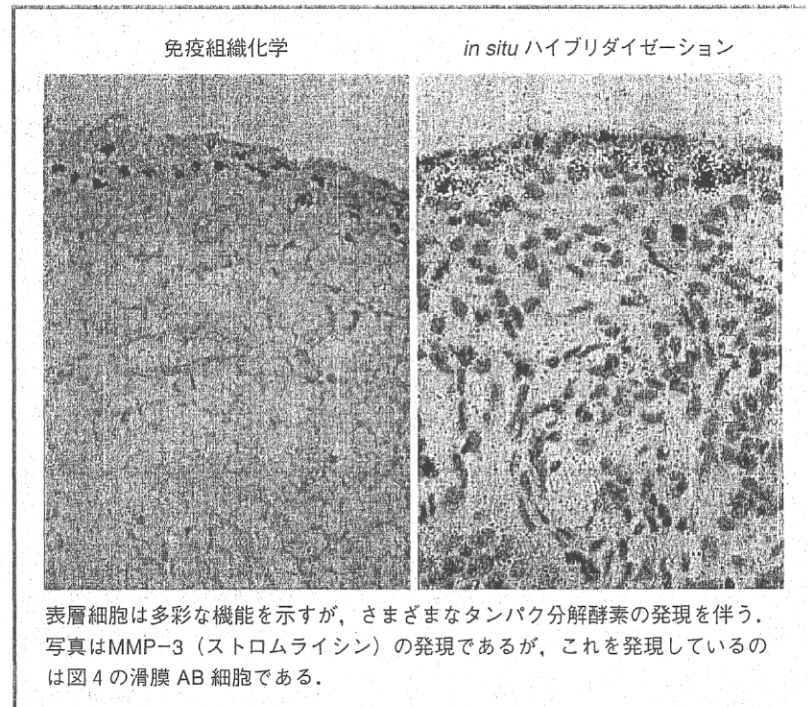
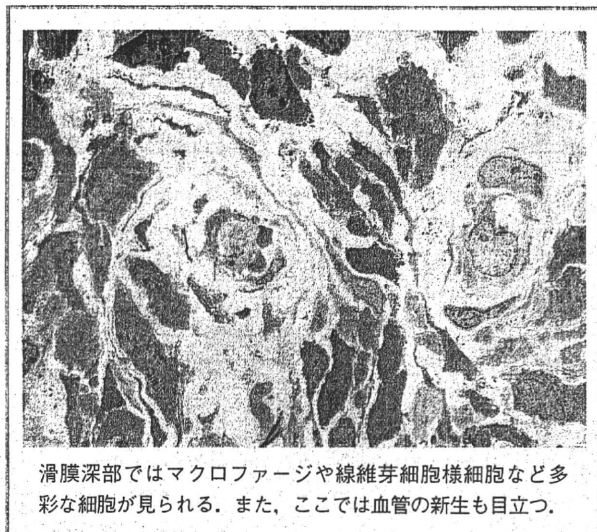




図6 滑膜深部の電顕写真



受けて関節腔に向かって遊走する<sup>10-13)</sup>。好中球はこの表層と血管網との間に数多く見られ、深層で見られることは少ない。したがって、関節液中では圧倒的に好中球や単球細胞の数が多く、リンパ球優位の滑膜組織とは極めて対照的である。この好中球はエラスターゼやカテプシンGなどのセリンプロテアーゼを多く有しているため関節液中にはこれらタンパク分解酵素が多量に含まれており、関節表層の軟骨を関節腔側から吸収していく。関節液もヒアルロ

ン酸を主体とした粘稠性の高い性質から滲出性液の特徴を有するさらさらした性質に変化し、含まれる酵素も好中球が放出するセリンプロテアーゼだけでなく、滑膜表層細胞によって産生、放出されたMMPs やアスパラギン酸プロテアーゼ、さらに分解される側の成分であるマトリックスタンパクも多量に含まれるようになる<sup>14)15)</sup>。

滑膜の深部では従来見られた脂肪組織は消失し、いわゆる炎症の本態を成す炎症性細胞浸潤と血管の新生が目立つ肉芽組織が優位になるが、ここに見られる細胞は多彩である。炎症性細胞浸潤だけでも種々のサブセットから成るリンパ球、マクロファージの他に線維芽細胞様細胞 (FLS) など図6のように電子顕微鏡的にみても実に多彩な細胞像を示している。この中で、FLSは組織球性マーカーのCD14陽性で滑膜の炎症と軟骨・骨の破壊にとって大きな意義を持つ。この細胞は一方では、樹状細胞系として免疫情報伝達機能、組織球系としてRAのキー細胞のような印象も受けるが、他方では、同じ紡錘形の細胞でもコラーゲンなどを産生する本来の線維芽細胞系なども示唆されて(図7)、図8のように幾つかの亜型のあることも考えられる。このFLSはHLA-DR陽性で種々のサイトカインを発現するが<sup>16-18)</sup>、CD14陽性で骨髄単球系細胞であることが示唆されるとともに、CD106(血管細胞接着分子:VCAM-1)も陽性という報告もあり、いまだ本体は完全に明らかになったわけではない。また、骨髄細胞由

図7 関節リウマチ (RA) 滑膜組織に見られる CD14 陽性細胞

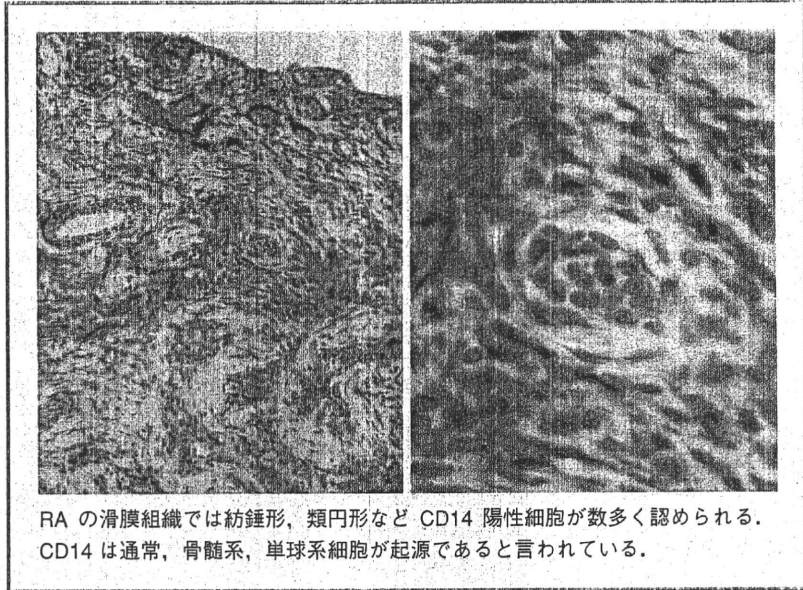


図8 滑膜細胞の起源のシエーマ

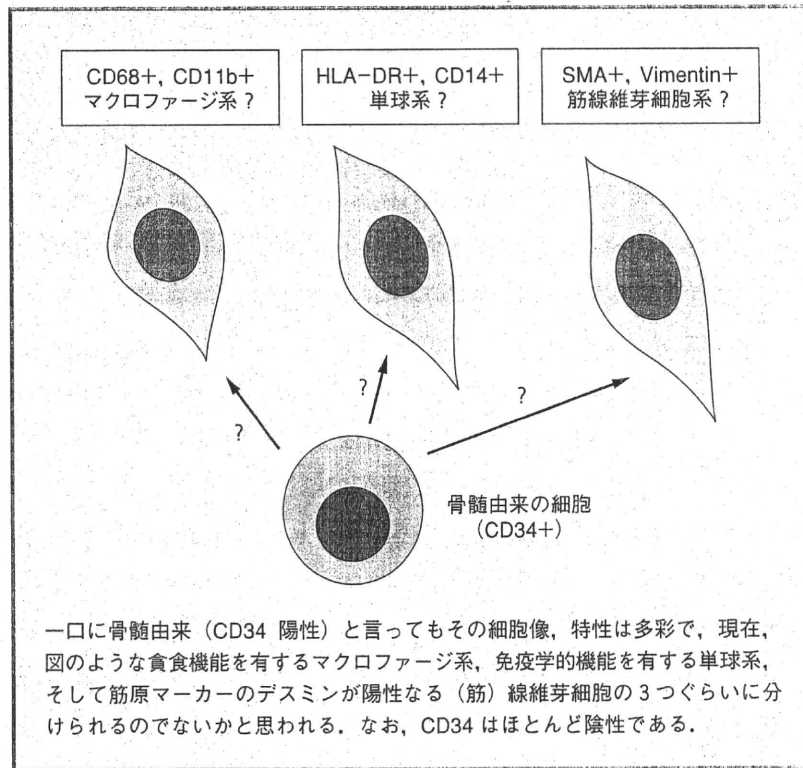


図9 関節リウマチ (RA) の肉芽組織 (パンヌス)



パンヌスは軟骨を吸収してさらにその奥にある骨の吸収に至るが、その状態はあたかも腫瘍が浸潤するのに類似している。

来ということで骨髄細胞の幹細胞との関係も示唆されたが、CD34 を発現している細胞は多くはなく、疑問視されている。さらに、この部位ではリンパ球と紡錘形細胞が情報交換、cross talk している像が見られる。このようにRAで見られる肉芽組織は非特異的な肉芽組織であるにもかかわらず、やはりリンパ球の浸潤が目立つため、通常の非特異的な肉芽組織に比べて違いがあるように思われる。このように、滑膜に始まった炎症はその組織中に多量のサイトカインやタンパク分解酵素を発現しながら側方あるいは深部に拡大して軟骨、骨の吸収を引き起すようになるが、特に骨破壊に関係するものについては pan-nocyte とも呼ばれていた<sup>19)</sup>。

## 軟骨・骨破壊

軟骨・骨の破壊については、それぞれを構成する成分や循環によってその障害の機序が異なる。その理由はそれぞれ組織構成の成り立ちが異なること、また循環、特に酸素に対する受けとめ方が異なることによる。骨はその構成がⅠ型コラーゲンとカルシウム、リンなどの無機質が中心になるのに対し、軟骨はⅡ型コラーゲン、プロテオグリカンが中心となっており、さらに骨はその栄養を血液循環に依存しているのに対し、軟骨では血流が豊富になると変性が進行する。したがって、それぞれの分解に関与する因子も異なり、この違いが将来、治療方法に検討を要する可能性が出てくるかも知れない。つまり、軟骨と骨の両者にとって共通する攻撃因子と、一方に対しては攻撃因子であるものの他方に対してはあまり影響を与えない因子などに分けて解析していく必要も出てくる。以下、軟骨、骨に対する攻撃因子を病理学的な面から眺めてみた。

### 1. 軟骨に対する攻撃因子

#### 1) パンヌス

パンヌスとはRAにみられる炎症性の肉芽組織のことであり、その主体は前述のごとく滑膜組織からの炎症の連続したものである。パンヌスの浸潤経路の1つは図9のように軟骨の表層をほうように伸展し、組織内の細胞が有するタンパク分解酵素により軟骨を吸収し、さ

らに浸潤して骨破壊に至る経路と、図10のように滑膜、軟骨の境界部(ベアエリア)から軟骨下を通して骨髓内に直接浸潤する経路である。軟骨・骨破壊、両者の面からみると共通に見られる細胞はマクロファージや前述のFLSであるが、骨吸収については破骨細胞が破壊の主力と成りうる(図11)<sup>20)</sup>。そのほか、動物モデルを用いて観察すると、軟骨下にOssification Groove of Ranvier (R輪)と呼ばれる発生学的に骨膜側より骨

図10 ベアエリアからの浸潤

