



慢性関節リウマチ滑膜における免疫グロブリンおよび金塩の局在

西林, 保朗

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1979-06-13

(Date of Publication)

2008-05-16

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0271

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000271>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



慢性関節リウマチ滑膜における免疫グロブリン
および金塩の局在

神戸大学医学部 整形外科

西林 保朗

慢性関節リウマチ, 滑膜
免疫グロブリン, 金塩
lysosome
lysosomal enzyme
crystal induced arthritis

慢性関節リウマチ滑膜における免疫グロブリンおよび金塩の局在

神戸大学医学部 整形外科 西林保朗

目次

- I. 緒言
- II. 症例および方法
 - 1. 症例
 - 2. 方法
 - i. 光学顕微鏡観察
 - a. HE染色
 - b. 金染色
 - ii. 蛍光抗体直接法
 - iii. 原子吸光分析法による金定量
 - iv. 電子顕微鏡観察
 - a. 金塩の超微形態
 - b. X線マイクロアナライザーによる分析
- III. 結果
 - 1. 光学顕微鏡観察
 - i. 組織型分類
 - ii. 金塩の局在
 - 2. Ig G, Ig M, C₃の局在
 - 3. 金定量 (投与量, 組織中濃度の相関関係の分析)
 - 4. 電子顕微鏡観察
 - i. 金塩の超微形態
 - ii. X線マイクロアナライザーによる金塩の証明
 - iii. 金塩の滑膜内での代謝
- IV. 考察
 - 1. 組織型分類について
 - 2. Ig G, Ig M, C₃の局在について
 - 3. 金塩の局在および作用機序について
 - 4. 金塩の滑膜内での代謝について
 - 5. 金塩の投与量および濃度について
- V. 結語
- 謝辞

I. 緒言

原因不明の慢性関節リウマチの病態を、治療上いかにうまくコントロールするか、Rheumatologistも苦慮するところである。1927年 Lande¹⁾ がはじめて慢性関節リウマチ (以下 RA と略す) に、金製剤を使用して、早くも50年が経過した。この間の多くの文献に見られるように、RA に非常に有効なことが分り²⁾³⁾一躍金製剤は RA 治療体系のなかで、重要な位置を占めることになった。

金塩は血中で、その95%までがアルブミンと結合して⁴⁾各組織に移行するが、その作用機序に関しては、いまだに不明な点が多い。1939年 Kling⁵⁾は金塩の効果は、全般的な網内系の活動性を高揚すると同時に、滑膜に蓄積して、その防御機構に関与して現れると述べた。Bollet⁶⁾はラットを用いた実験で、金塩投与によって、結合織内の fructose-6-phosphate-glucosamine transamidase の活性を抑制して、mucopolysaccharide の生合成に影響を及ぼすことを示した。また Adam⁷⁾は金塩がコラーゲンの安定化を起すと述べ、金塩の膠原線維への作用に注目した。一方 Persellin⁸⁾は lysosomal enzyme への作用を強調した。腹腔内注射で、guinea pig のマクロファージの lysosome に高濃度に蓄積して、lysosomal enzyme である acid phosphatase や β glucuronidase の活性を抑制する事実から、金塩の作用機序は、RA の炎症滑膜組織中の、食細胞の lysosomal enzyme の活性を抑制することによるだろうと予測した。この lysosomal enzyme の活性を、金塩が抑制するという考えは、Wegelius⁹⁾や Weissmann¹⁰⁾の論文でも支持されている。その後、抗体産生能に関与することが指摘されてきた。すなわち Scheiffarth¹¹⁾は抗体産生を抑制するとし、逆に Ebel¹²⁾は促進させると述べている。また、Persellin¹³⁾や大坪¹⁴⁾は抗体産生能には影響なしとしており、これに関しての意見は一致していない。

以上のように、RA に対する金塩の作用機序に関して、実験的あるいは臨床的データの裏付けをもとにした、諸説が発表されているが、まだ結論に達していないのが現状である。

また実際に、金療法が有効で長期間金製剤の投与を受け、病状がよくコントロールされているにもかかわらず、時として関節炎症状が強くなる患者に遭遇することがある。著者はこのような点に注目し、滑膜切除時に得た組織を用い、免疫病理学的検索を行うとともに、組織内での金塩の代謝を、光顕レベルおよび電顕レベルで形態学的に捉えた。これらの知見にもとづいて、金塩の作用機序および金製剤使用中の関節炎増悪の成立機構についても考察したので、その結果を報告する。

II. 症例および方法

1. 症例 (表1)

アメリカリウマチ協会の診断基準にもとづく、17例19関節の classical rheumatoid arthritis について検索した。これらの症例はすべて sero-positive RA であった。なお3例3関節の変形性関節症 (以下 OA と略す) を対照として同時に観察した。RA 症例の内訳は、男性2例2関節、女性15例17関節で、29才から69才におよび平均52.2才であった。Stage および class は表1に示すとおりで、罹病期間は6ヶ月から25年にわたり、平均10年8ヶ月であった。手術までに受けた金製剤 Aurothiomalate (Shiosol) の総量は表3に示すごとくであった。標本採取部位は、膝8関節、手5関節、股・足・肘各2関節であった。これらすべての症例は、強い関節炎症状を有しており、burnt-out の OA 変化に対しての手術症例は含まれていない。

2. 方法 (表2)

手術時に得た滑膜の各所より、多数の薄片を採取し、3群に分けてそれぞれ10%ホルマリン、95%冷エタノールおよび2.5~5%グルタルアルデヒドで固定し、各々の検索材料にした。残った滑膜は、脂肪組織や関節包を十分に切除して、原子吸光法により滑膜中の金定量を行った。

i. 光学顕微鏡観察

a. HE 染色

HE 染色標本の観察を行い、大高の分類¹⁵⁾に従って、滑膜炎の組織型分類を試みた。すなわち第I型はフィブリノイド物質の析出・沈着を伴った、肉芽組織が主体のフィブリノイド型。第II型は肉芽形成を伴った炎症細胞浸潤型。第III型は前二者を含む混合型。第VI型は癥痕型である。

b. 金染色

(Okamoto)らの方法¹⁶⁾に従い、ホルマリン固定後

パラフィン切片を作製し、パラジメチルアミノベンチリデンロダニンで、36℃24時間染色した。光顕観察を行い、赤紫色あるいは赤褐色に着色した粒子を金と判定した。

ii. 蛍光抗体直接法

Sainte-Marie の方法に準じた京極らの方法¹⁷⁾に従って、パラフィン切片を作製した。抗血清はヘキスト社ベリング研究所製の FITC (Fluorescein Isothiocyanate) 標識抗ヒト Ig G ウサギ血清、FITC 標識抗ヒト Ig M ウサギ血清、FITC 標識抗ヒト C₃ ウサギ血清を使用した。これらを20倍希釈した後、3,000回転10分間遠沈し、ミリポアフィルターを通して染色液とした。脱パラフィンを行ったスライドガラスを湿室 (moist chamber) 内に置き、組織片上を染色液で覆い、4℃で over night 反応をおこさせた。特異性の検定には、FITC で標識されていない抗血清を用いて、あらかじめ反応させた後に、同様の方法で標本を作製した (blocking test)。カールツァイス社製蛍光顕微鏡にて、直接倍率160倍または400倍で観察した。

iii. 原子吸光分析法による金定量

採取した滑膜は、磁製ルツポに入れ100℃ over night で十分に乾燥した後に、電気炉で100℃/時の速さで500℃まで加熱し、灰化させた¹⁸⁾。乾燥重量を測定した後、0.1N硝酸1mlに溶解し、¹⁹⁾日本ジャーナルアッシュ社製の原子吸光装置で、金の含有量を測定した。単位は $\mu\text{g gold/g dry weight tissue}$ とした。なお血中濃度も同様に測定した ($\mu\text{g gold/dl}$)。

得られた結果から、金塩投与総量と血中濃度、金塩投与総量と滑膜中濃度、血中濃度と滑膜中濃度の相関係数を求めて、金塩の組織移行の状態を統計学的に解析した。また、投与総量2,000mg以下のグループと2,000mgを超えるグループとに分けての検討も行った。

IV. 電子顕微鏡観察

a. 金塩の超微形態

切片は通常の方法で作製し、²⁰⁾醋酸ウラン単染色、あるいは醋酸ウラン・醋酸鉛の二重染色をほどこし、HS-7 および H-300 日立電子顕微鏡にて、直接倍率2,000倍~10万倍で観察した。

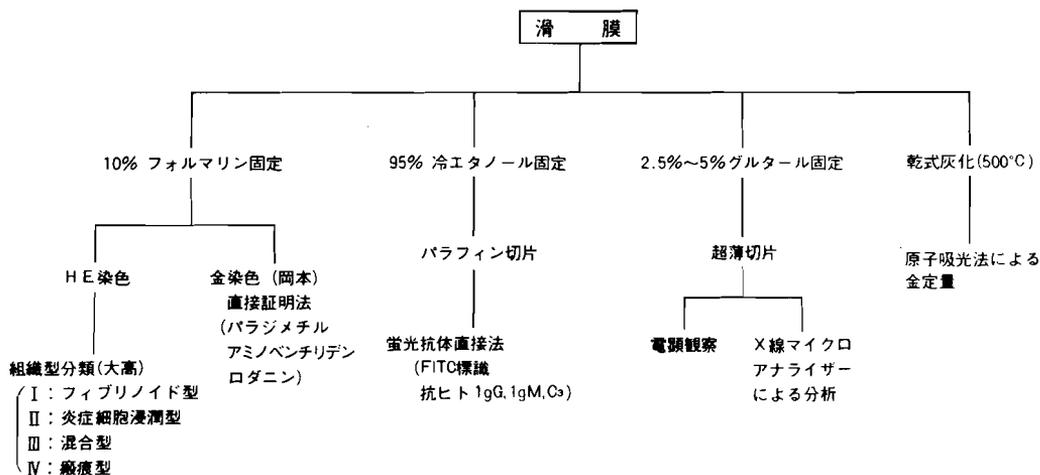
b. X線マイクロアナライザーによる分析

超薄切片を用いて、金粒子と思われる、電子密度の高い物質の元素分析を、X線微小分析の手法²¹⁾で行った。Auの検出の場合、標本の固定材料やメッシュには大きな問題がないので、²¹⁾電顕観察と同一のブロックより、超薄切片を作製した。ただし切片はやや厚くして、醋酸ウラン単染色をほどこした。H-

表1 症 例

症 例	年 令 才	性 別	Stage	Class	罹病期間 年	標本採取部位	
1	KT	34	♀	Ⅳ	Ⅱ	8	手
2	MI	65	♂	Ⅱ	Ⅱ	8	手
3	SA	66	♀	Ⅳ	Ⅲ	12	手
4	SI	41	♀	Ⅱ	Ⅱ	8	膝 足
5	FH	48	♀	Ⅲ	Ⅲ	18	膝
6	MK	45	♀	Ⅱ	Ⅱ	3	足
7	SY	63	♀	Ⅰ	Ⅲ	8	膝 手
8	KD	29	♀	Ⅳ	Ⅲ	18	膝
9	FO	51	♀	Ⅳ	Ⅳ	19	股
10	SY	46	♂	Ⅳ	Ⅲ	25	肘
11	YO	46	♀	Ⅳ	Ⅱ	14	肘
12	FS	55	♀	Ⅲ	Ⅳ	1	股
13	MN	53	♀	Ⅱ	Ⅱ	0.5	手
14	HT	69	♀	Ⅳ	Ⅳ	15	膝
15	HS	60	♀	Ⅳ	Ⅲ	10	膝
16	KH	59	♀	Ⅳ	Ⅲ	12	膝
17	KK	58	♀	Ⅲ	Ⅱ	8	膝
I	MK	19	♀		O A		股
II	WK	31	♀		O A		股
III	MO	13	♀		O A		股

表2 方 法



10% フォルマリン固定

- H E 染色
- 金染色 (岡本) 直接証明法 (パラジメチルアミノベンチリデン ロダニン)

95% 冷エタノール固定

- パラフィン切片
- 蛍光抗体直接法 (FITC標識 抗ヒト IgG, IgM, C₃)

2.5%~5% グルタル固定

- 超薄切片
- 電顕観察
- X線マイクロアナライザーによる分析

乾式灰化 (500°C)

- 原子吸光法による金定量

組織型分類 (大高)

- I: フィブリノイド型
- II: 炎症細胞浸潤型
- III: 混合型
- IV: 癒痕型

500 日立トータル走査電子顕微鏡で観察し, Kevex 5100 エネルギー分散型 X 線分析装置で, 元素分析を行った。

Ⅲ. 結果 (表 3)

1. 光学顕微鏡観察

ⅰ. 組織型分類

I 型はわずかに 1 例 5.9% であった。II 型が 9 例 52.9% と一番多く, ついで III 型が 5 例 29.4% を占めた。IV 型は 2 例 11.8% であった。

I 型は表層のフィブリノイド変性が主で, 表層細胞の増殖も軽度に見られた。しかし, 炎症細胞浸潤はほとんど認めなかった (図 1-a)。II 型では表層下組織の血管周辺に, リンパ球・形質細胞など炎症細胞の集簇する傾向があり, 9 例中 7 例にリンパ滲胞様の構造が見られた (図 1-b)。またこの型では一般に, 表層細胞の増生と, 絨毛形成が認められた。III 型では炎症細胞浸潤に加えて, 表層細胞の増生が著名であった (図 1-c)。IV 型では表層細胞の増生はなく, 表層下組織の強い癒痕形成が目立った (図

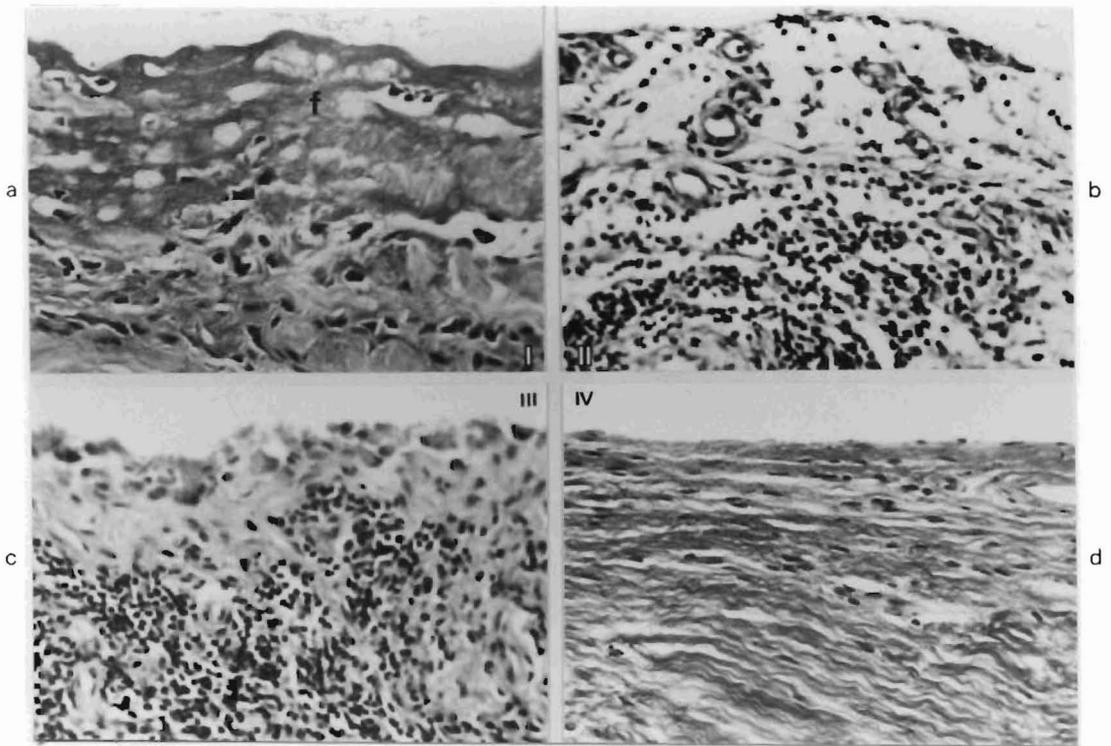


図1-a, b, c, d. 組織型分類。(a)I型. フィブリノイド型. 表層および間質へのフィブリノイド物質fの沈着が著明にみられる。(b)II型. 炎症細胞浸潤型. 表層下組織の肉芽形成と血管周囲への炎症細胞の集簇がみられる。(c)III型. 混合型. 表層部へのフィブリノイド物質の沈着と, 表層下組織への炎症細胞の浸潤がみられる。(d)IV型. 癭痕型. 線維化および癭痕化が著明で, 炎症細胞浸潤はほとんどみやれない。(HE染色, x 200)

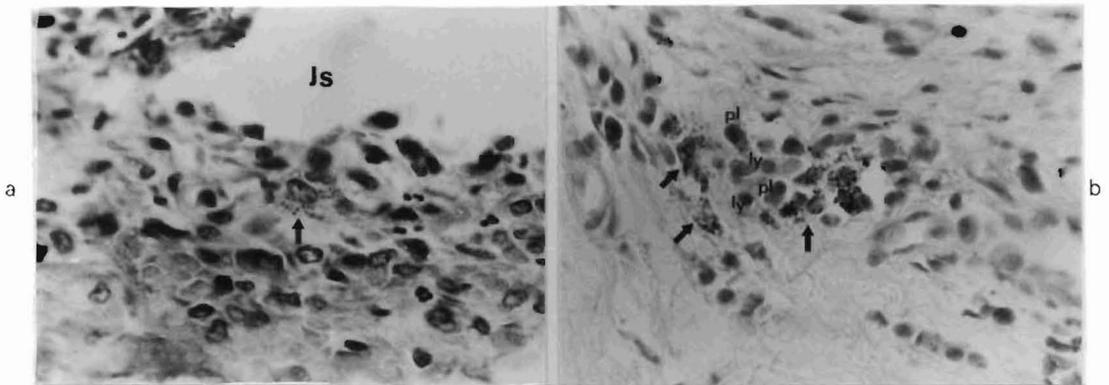


図2-a, b. 金塩の局在。(a)増殖した表層細胞の細胞質に金の沈着(↑)が認められる。(b)血管(Bv)周辺のマクロファージに著明な金の沈着がみられる。しかしリンパ球(ly)や形質細胞(pl)には認めない。(金染色, x 400)

し、形質細胞やリンパ球には認められなかった。組織学的に見た場合、金塩の投与量と組織中の金の出現頻度とは、はっきりした関係はみられなかった。

2. Ig G, Ig M, C₃の局在

Ig Mに比較して、Ig Gは一般に強い陽性所見が得られた。表層部では主に、表層細胞やその表面が陽性となった(図4-a, b)。この部でIg Gは17関節

すべてに、Ig Mは16関節中9関節(56.3%)に認められた。表層下組織では主に、血管周囲に集簇する炎症細胞の細胞質内に存在した。Ig Gは17関節中16関節(94.1%)に、Ig Mは16関節中14関節(87.5%)に陽性であった。これらの細胞は形態学的に見て、形質細胞、リンパ芽球およびマクロファージと考えられた(図4-c, d)。形質細胞やリンパ芽球では

一般に、均一に染色され、マクロファージでは微細顆粒状に染色されていた。しばしば、マクロファージに接して反応陽性のリンパ芽球が観察された。

C₃は表層細胞やフィブリノイド物質への沈着が目立っていた(図5-a)。また表層下組織の間質や、血管壁への沈着も時に認められた(図5-b, c)。表層下組織では17関節中12関節(70.6%)に、表層下組織では17関節中9関節(52.9%)に陽性所見が得られた。

そして、これらのうちの8関節の陽性所見は、Ig GあるいはIg Mと同じ陽性パターンを示していた(図6)。

3. 金定量

術前17例中16例に金塩の投与が行われており、投与総量は50mgから多いものでは7,605mgにもおよび、平均2,029mgであった。血中濃度は70~730 μ g/dl,

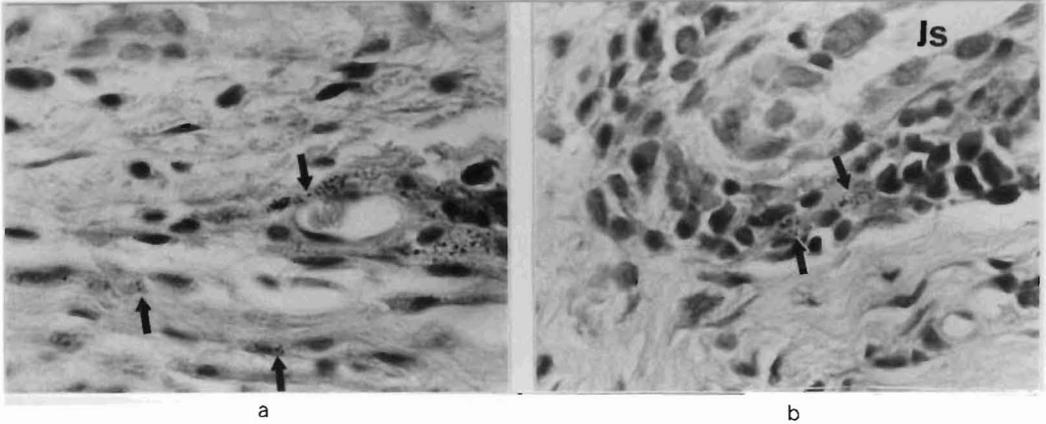


図3 -a, b. 金塩の局在。(a)表層下組織の線維芽細胞に金の沈着(↑)が認められる。(b)増生した表層細胞の細胞間に金が見られる(↑)。 Js: 関節腔。(金染色, x 400)

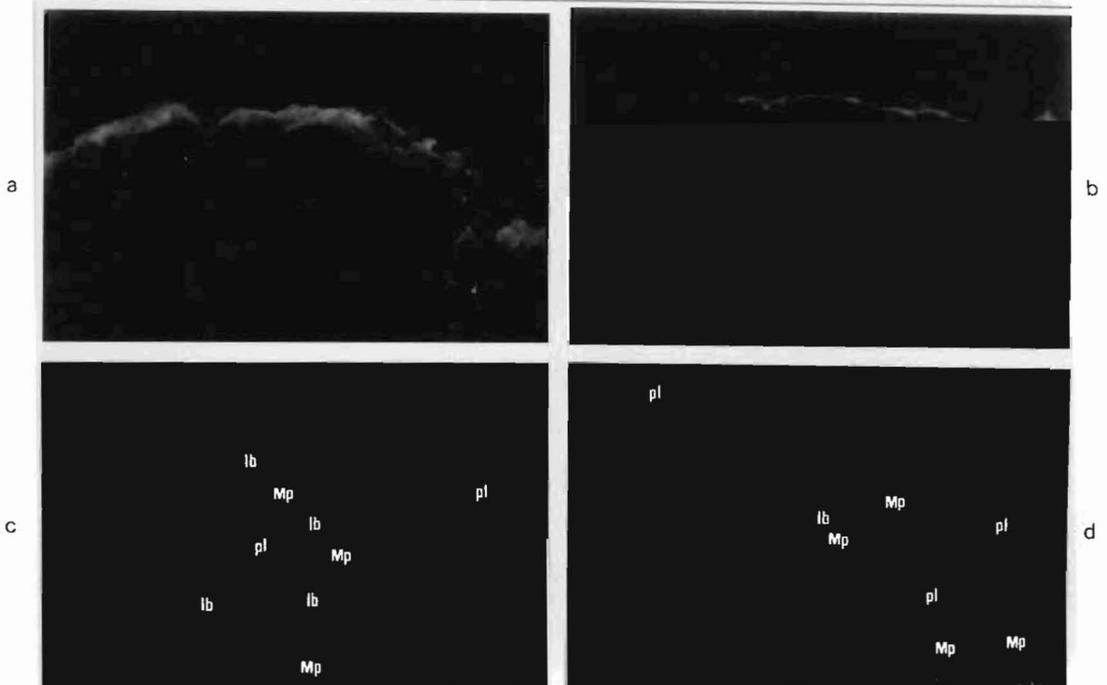


図4 -a, b, c, d. IgG, IgMの局在(a)滑膜表層部に抗Ig Gが陽性となり、Ig Gの存在が証明される。(b)滑膜表層部にIg Mが認められるが、Ig Gの所見よりは弱い。(c)表層下組織の炎症細胞集簇部に多数のIg G陽性細胞が見られる。マクロファージ(Mp)に接して反応陽性のリンパ芽球(lb)が認められる。マクロファージの染色パターンは一般に顆粒状であり、形質細胞やリンパ芽球に比して弱い。(d)Ig Mでも同様の所見が得られる。(蛍光抗体法, x 400)

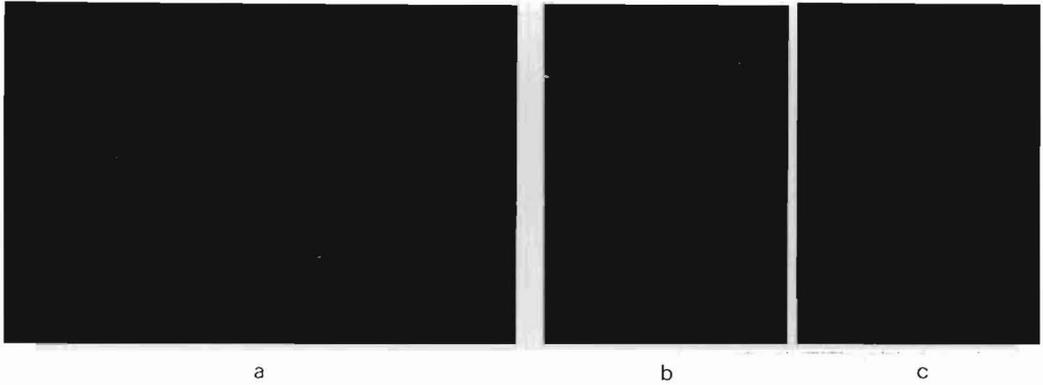


図5-a, b, c. C_3 の局在。(a) C_3 は表層細胞やフィブリノイド物質で強い陽性所見が得られた。(b)表層下組織の間質での陽性所見。(c)血管壁への沈着も認められる。(蛍光抗体法, a, b: x 400, c: x 160)

平均 $302\mu\text{g}/\text{dl}$ であり, 滑膜中濃度は $0\sim 555\mu\text{g}/\text{g}$, 平均 $115\mu\text{g}/\text{g}$ であった。

投与量と生体内での濃度との相関関係を検討した。金塩投与総量と血中濃度の相関係数は 0.224 で, 有意な相関を示さなかった(図7-a)が, 投与総量 $2,000\text{mg}$ 以下のものに限って見れば, 相関係数 0.792 (危険率 1% 以下) となり, 統計学的に有意な相関関係を示した(図7-b)。すなわち, ほぼ 1 クールに達するまでは, 投与総量の増加に応じて, 血中濃度も上昇する傾向にあるといえる。次に投与総量と滑膜中濃度の関係を見ると, 相関係数は 0.510 (危険率 5% 以下) で有意性を示した(図8-a)。これに反して, 投与総量 $2,000\text{mg}$ 以下の場合, 相関係数は 0.258 であり, 有意性は認められなかった(図8-b)。一方, 血中濃度と滑膜中濃度との間には, 何ら相関関係は認められなかった(図9)。

4. 電子顕微鏡観察

i. 金塩の超微形態

出現する細胞は, F型およびM型表層細胞²⁴, リンパ球, 形質細胞, リンパ芽球, マクロファージ, 白血球, 線維芽細胞, 血管内皮細胞, pericyte, 肥胖細胞であり, 金塩の投与を受けなかった症例との間に, 差異はなかった。しかし金塩投与例では, 主にM型表層細胞とマクロファージの lysosome および phagosome に特徴的な所見が得られた(図10)。またこれらの細胞で, 変性に陥っているものでは, この特徴が一層顕著に認められた。

これらの細胞の, 直径 $0.2\sim 0.4\mu$ の secondary lysosome および, 限界膜を有する $1\sim 4\mu$ の phagosome 内に, 金粒子と思われる, 電子密度の高い顆粒や, 針状体あるいはカールした毛髪様の結晶物を認めた(図11)。注意深く観察すると, lysosome ではこのような粒子の認められるものと, 認められな

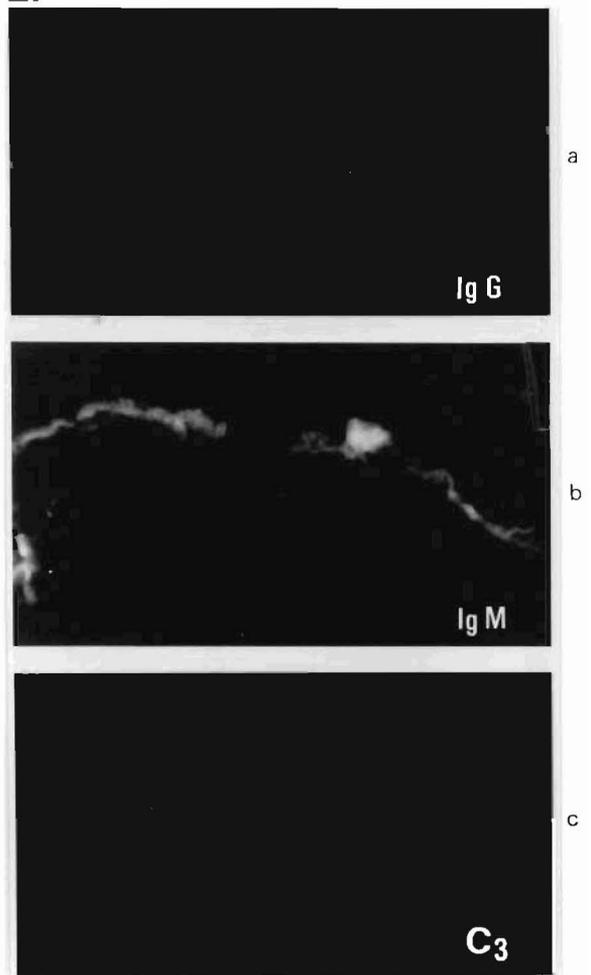
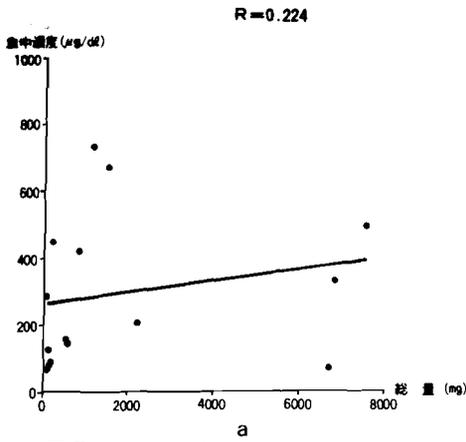


図6-a, b, c. Immune complex の証明。症例15. Ig G (a), Ig M (b), C_3 (c)とも表層部で同様の陽性パターンを示し, immune complex の存在を表わす。(蛍光抗体法, x 400)

投与総量と血中濃度の相関



投与総量と血中濃度の相関

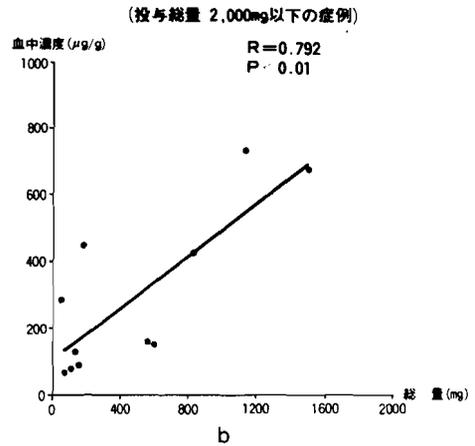
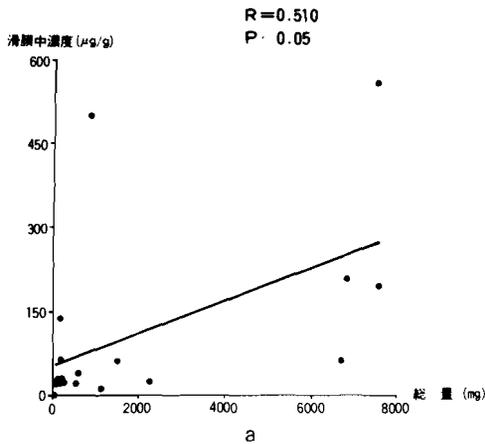


図7-a, b. (a)金塩の投与総量と血中濃度の間には有意な関係はみられない。(b)ただし、投与総量が2,000mg以下の症例では、両者間に相関係数0.792の高い相関が認められる。

投与総量と滑膜中濃度の相関



投与総量と滑膜中濃度の相関

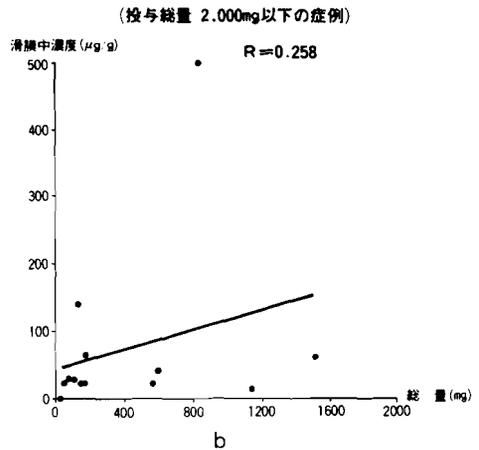
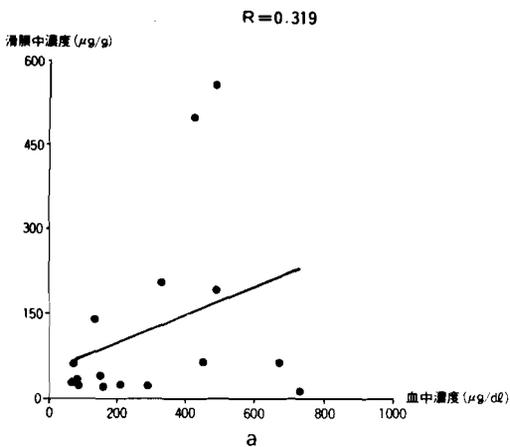


図8-a, b. (a)金塩投与総量と滑膜中濃度との間にはわずかに相関が認められる。(b)投与総量2,000mg以下の症例では有意性は認められなかった。

血中濃度と滑膜中濃度の相関



血中濃度と滑膜中濃度の相関

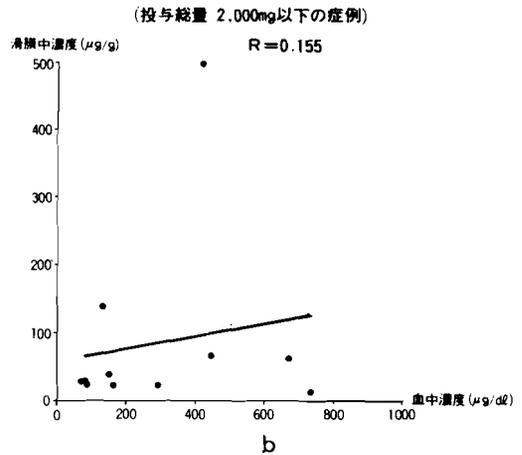
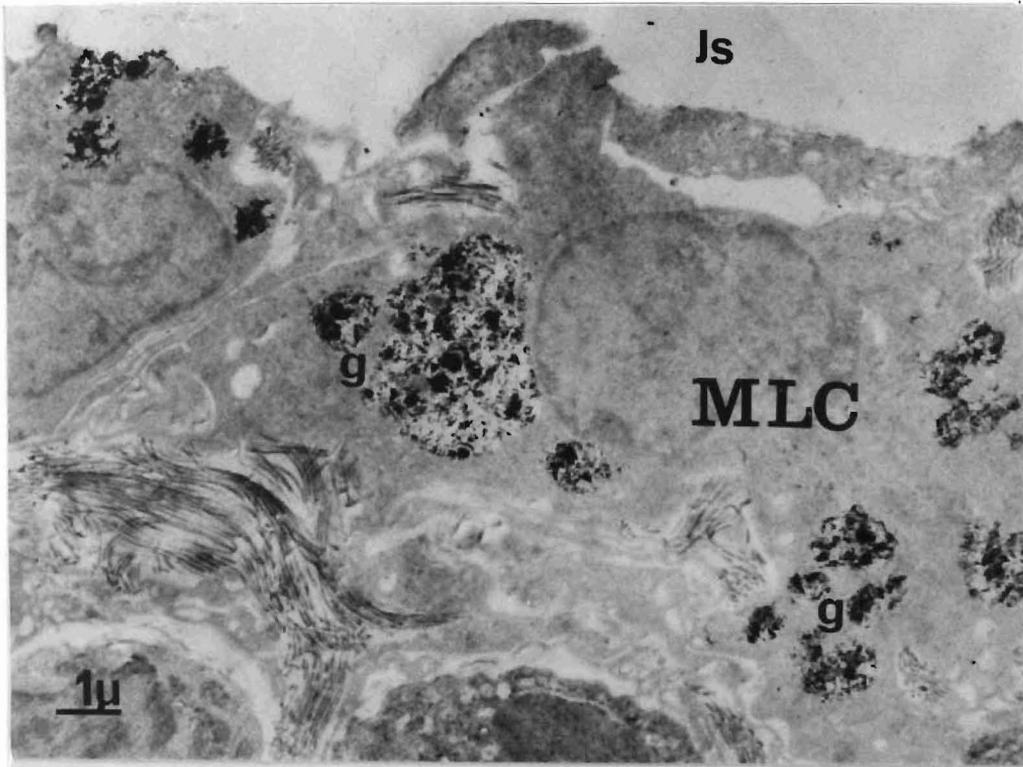
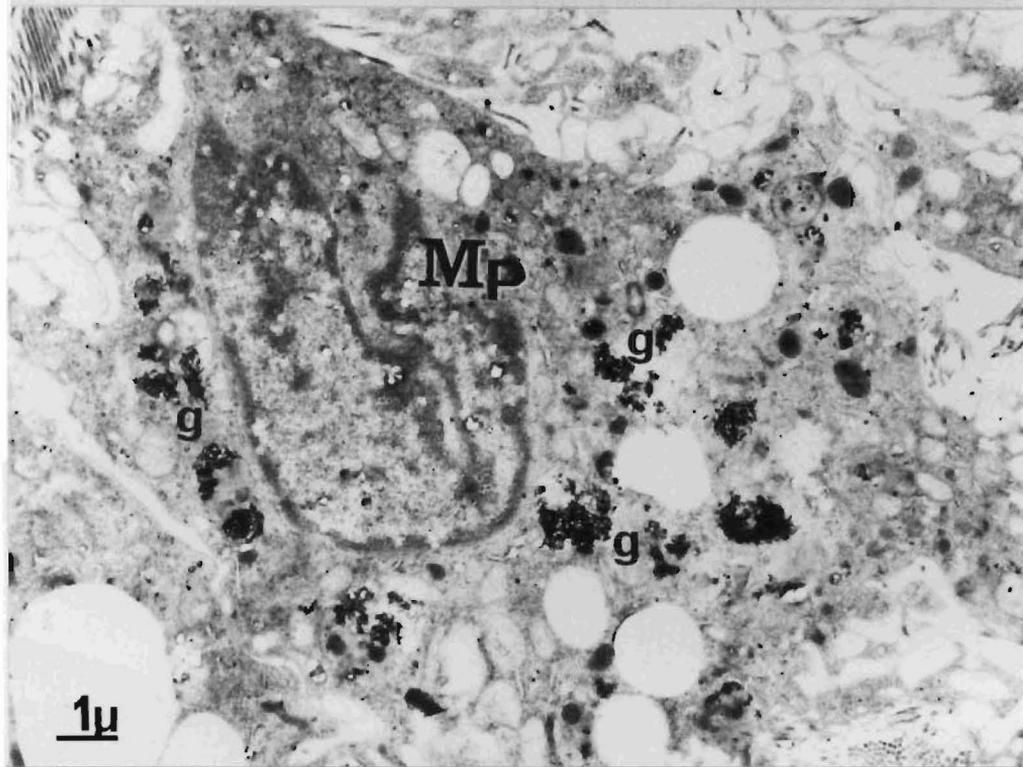


図9-a, b. 血中濃度と滑膜中濃度の間には、投与量の多少に関係なく有意な相関は認められない。

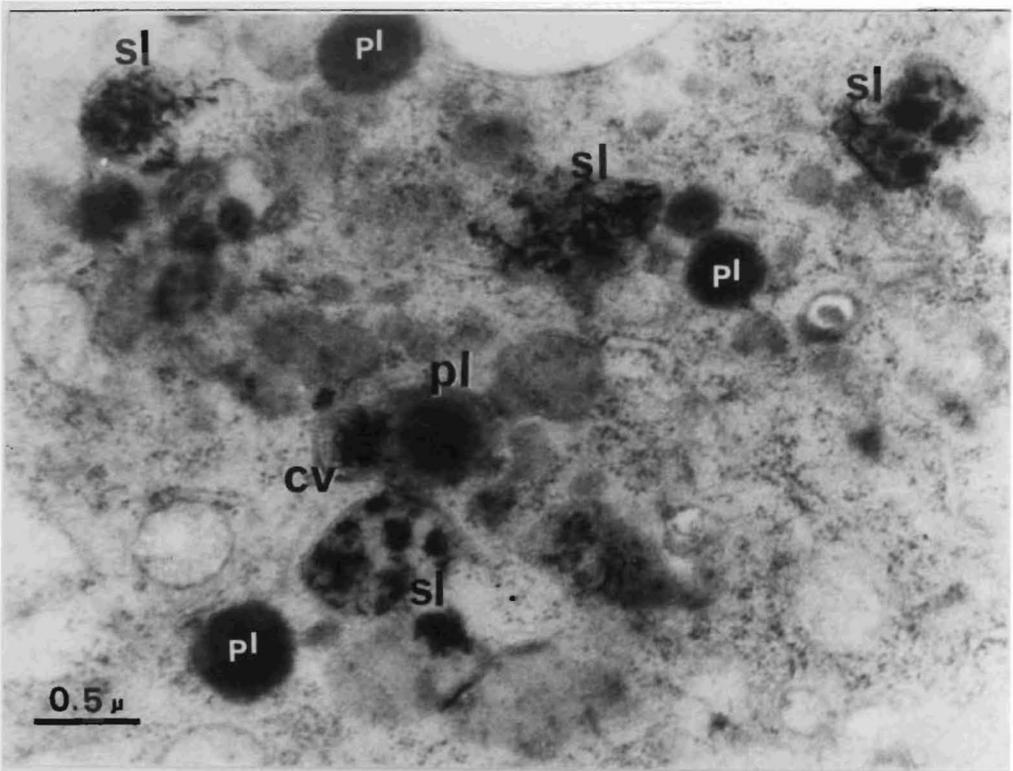


a

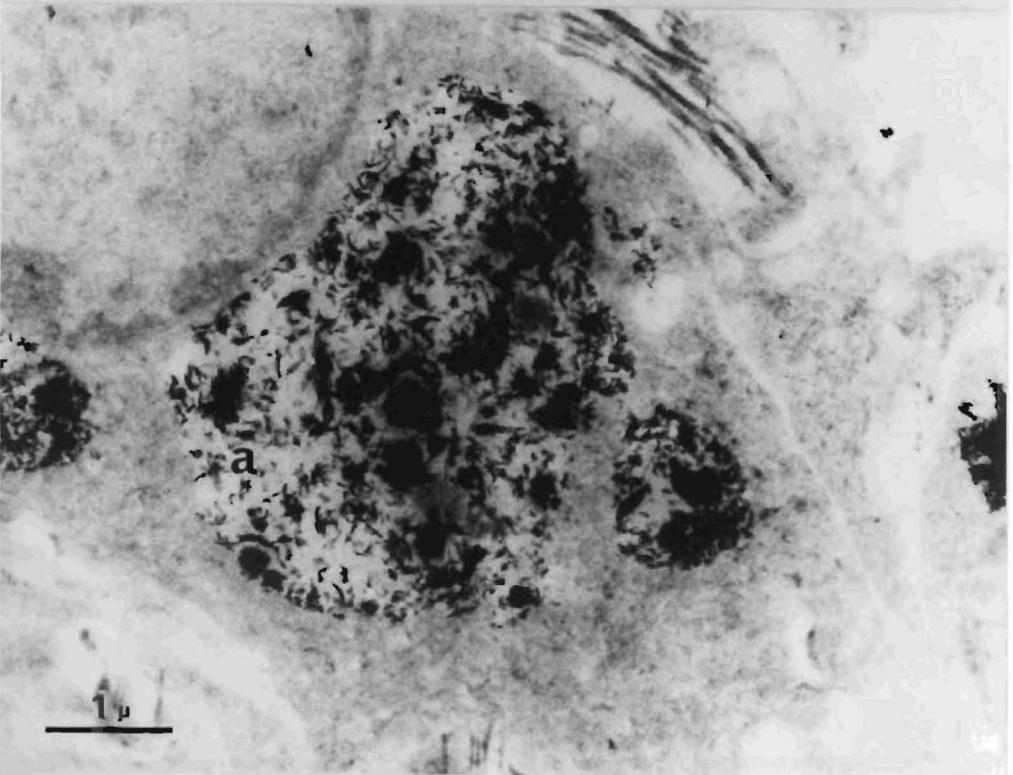


b

図10-a, b. 金塩の電顕像。(a)M型表層細胞(MLC)の細胞質に、金塩(g)を含む種々の phagosome がみられる。(b)表層下組織中のマクロファージ(Mp)でも同様の所見が得られる。



a



b

図11-a,b. 金塩と lysosome. (a)secondary lysosome (sl)内に金粒子がみられる。金粒子を持たない primary lysosome(pl)も存在し、時には primary lysosome が金粒子を含む coated vesicle(cv)と融合を起こそうとしている所見も得られる。(b)大きな phagosome 内には顆粒状・針状・カールした毛髪状など種々の形状を示す金粒子がみられる。N:核。

いものがあった。これら高電子密度の粒子は、小さい secondary lysosome 内のものほど小さく、羽毛状の繊細なものであり、大きな phagosome では形状も前述のように様々となり、大きな結晶物も含んでいた(図12-a, b, c, d)。このような形態の異同を検索する目的で、種々の異った形態の結晶物を持つ大きな phagosome を、分解能のすぐれた電子顕微鏡を用いて、10万倍に達する高倍率で観察した。この結果、低倍率では様様な異った形態をとっていた結晶物は、すべて直径6~13 μ mの微細顆粒が集積して形成されていることが判明した(図12-e)。

ii. X線マイクロアナライザーによる金の証明

Phagosome 内の、金粒子と思われる電子密度の高い部分を分析した結果、Au の特性X線に一致したスペクトルのピークが認められ、この部分に金の含まれることが証明された(図13-a, b)。また Au 以外に U, Os, P, Cu, Cl, Si などのピークも認められた。これらはコントロールとして分析した、任意の細胞質内の1点での分析結果認められた元素と一致した。さらに、同一視野での線分析および面分析でも、これらの高電子密度の粒子は、金を含有することが確

認された(図13-c, d)。すなわち、今回の電顕観察中に認められた、このような形態をした、電子密度の高い結晶物には、金の含まれていることが証明された。

iii. 金塩の滑膜内での代謝

滑膜内での金塩の動態をつかむ目的で、さらに詳しく金粒子を追跡した。L. lysosome あるいは phagosome を見る時、図11-aに示すように、直径0.2~0.4 μ m程度の小さな lysosome や phagosome では、金粒子は非常に繊細な形で存在し、大きな phagosome では次第に大きくなっていった。そして時には、限界膜が部分的に欠損し、金粒子も減少した phagosome も認められた(図14)。そしてこれらの lysosome を注意深く観察すると図11-a中央に見られるように、金粒子をつつみ込んだ coated vesicle と primary lysosome が融合を起して、金を持つ secondary lysosome を形成しようとする所見も得られた。

次にこれらを細胞のレベルで検索した。空胞変性に陥りつつあるマクロファージの細胞質内に、多量の金粒子がしばしば認められた(図15-a)。また変性を起して死んだ、金粒子を持つ細胞が、多核白血球

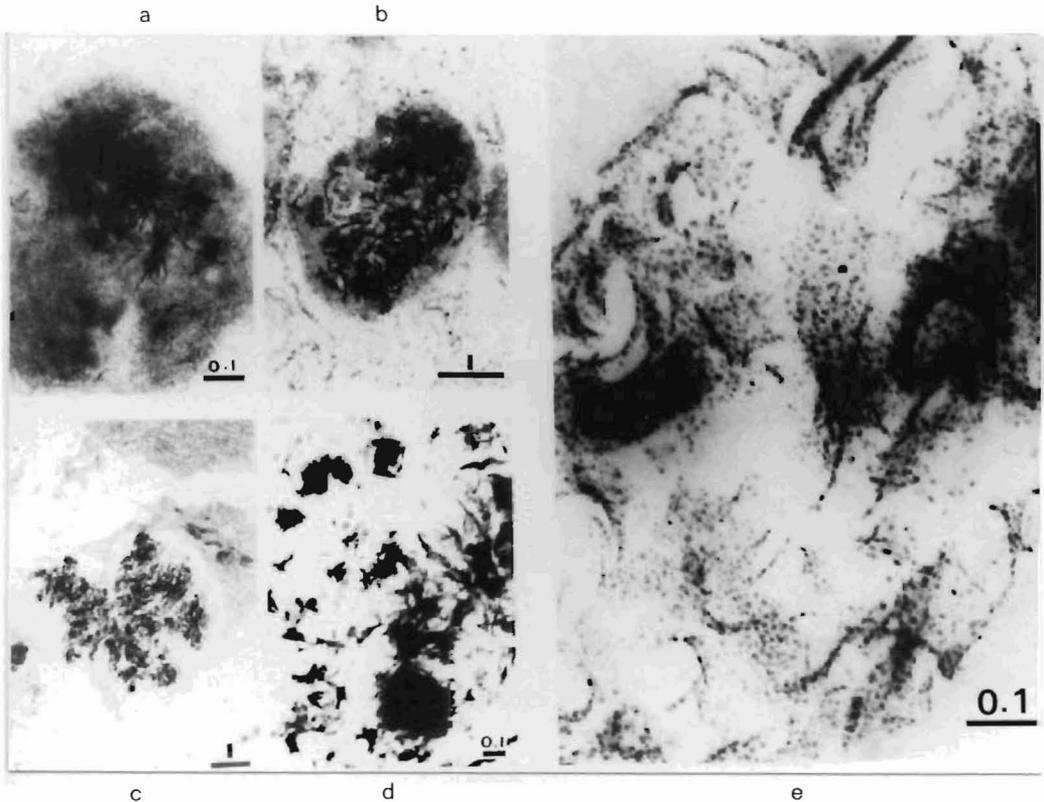


図12-a, b, c, d, e. 金粒子の形状。(a, b, c, d) 大きさの異なる lysosome や phagosome で金粒子は種々の形状をとっている。(e)しかし高倍率(10万倍)では、これらは6~13 μ mの微細顆粒の集積像として観察された。

に貪食されている所見も見られた(図15-b)。あるM型表層細胞は関節腔に向って、金粒子を exocytosis により放出しようとしており(図16-a)、他方では細胞突起を多数出して、金粒子を endocytosis により貪食していた(図16-b)。また、表層細胞のフィブリノイド物質内や、表層下組織の間質にも金粒子が存在した(図16-c, d)。

IV. 考察

今回検索した RA の症例は、保存的な治療によく反応しなかったり、関節炎症状が増悪したために、手術を受けたものである。また、第11例を除いては、すべて金療法を受けた症例である。ゆえに、実験結果の考察にあたっては、この事実を十分に踏まえておく必要がある。

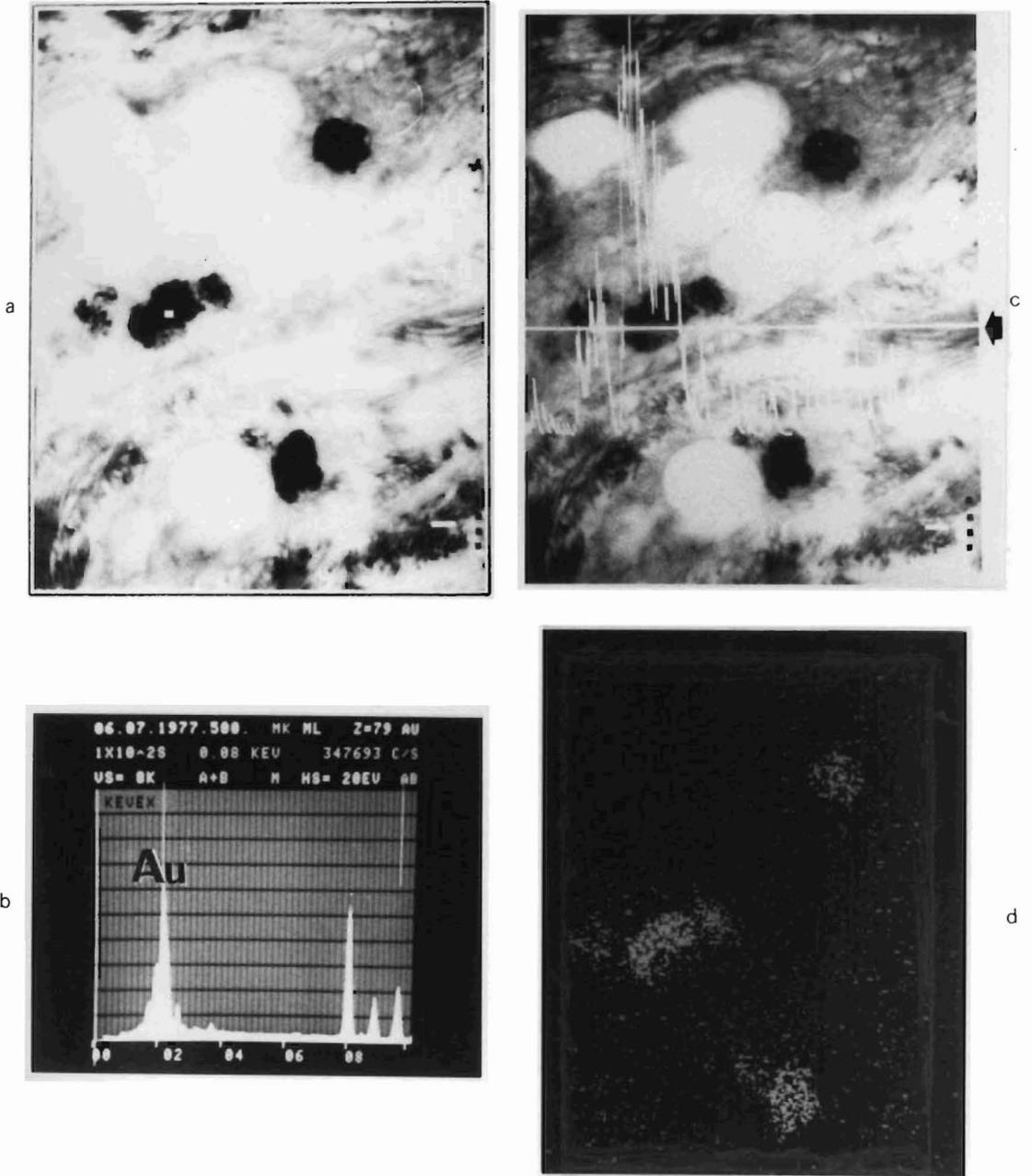


図13-a, b, c, d. X線マイクロアナライザーによる金塩の証明。(a, b)点分析。金を含むと思われる電子密度の高い顆粒の一点(■)より得られた特性X線のスペクトル中に、金(Au)の特性X線と一致するピークが認められた。(c)線分析。(←)で示す線上での分析。顆粒を横断する部位で高いピークが得られる。(d)面分析。視野全域の走査で顆粒の部位に一致して金の存在が証明される。

1. 組織型分類について

大高の分類で、第Ⅱ型に相当するものが9例で約50%を占めていた。大高²⁵⁾は関節の破壊に関与する滑膜の組織変化は、第Ⅰ型とみなすことができると述べており、Muirden²⁶⁾らはリンパ球浸潤の強い症例では、組織破壊が少ないのに反し、表層細胞の増生しているものでは、破壊が強くなる傾向にあるとしている。しかし今回の症例では、第Ⅰ型は1例であり、表層細胞増生を伴う第Ⅲ型を加えても、6例(35%)であり、単に組織型と関節組織破壊からの観点では、大高やMuirdenの指摘するような結果は得られなかった。ただし本症例の背景を考慮すれば、関節炎増悪や関節破壊の要因として、単に組織型だけでなく、金療法などの治療による影響や修飾などが挙げられるのではないかと考えられた。

2. Ig G, Ig M, C₃の局在について

一般にIg Gの沈着がIg Mに比較して、強く認められたが、Ig Mもよく観察された。文献的に見ても、各報告者によって多少の違いがあり、意見の一致を見ないところである²⁷⁾

Sliwinskiら²⁸⁾はin vivoで、Smileyら²⁹⁾はin vitroで、RA滑膜における免疫グロブリンの産生を証明した。Smileyらはラジオアイソトープを使用して検索した結果、RA滑膜には、正常人の脾臓やリンパ節と同じ程度の、免疫グロブリン産生能があることを示し、産生されたもののうち、79%はIg Gであったと述べている。今回の検索で、Ig G, Ig Mが形質細胞やリンパ芽球に見られたが(図4-c, d)、このことはとりもなおさず、免疫グロブリンの関節滑膜での産生を意味しており、彼らのデータに一致する形態学的な所見であった。Tursiら³⁰⁾は、Ig Gリウマチ因子とIg G-β₂C complexを、蛍光抗体法で

同時に染色して、immune complexの存在を証明しているが、本研究では、補体成分C₃をimmune complexの標識として用いた。C₃がIg GまたはIg Mと同じパターンで認められる時、immune complexの間接的な証明となる³¹⁾ことを利用した。C₃は表層では17関節中12関節に、また深層の血管や間質では17関節中8関節に、Ig GあるいはIg Mと同一パターンで陽性所見が得られ、immune complexが存在すると考えられた。Immune complexが形質細胞やリンパ芽球に存在せず、フィブリノイド物質や間質に認められることは、当然の結果といえる。Zvaifler³²⁾が示すリウマチ関節炎発生の機構からわかるように、immune complexは関節液中の多核白血球に貪食されることによって、関節炎を惹起すると考えられる。Ishikawaら³³⁾はimmune complexの軟骨への沈着が、関節炎の慢性化をもたらす一要因と考えている。しかし軟骨への沈着ばかりでなく、半月・靭帯をはじめ、表層下組織の間質や、表層細胞・フィブリノイド物質などへ沈着したものが、徐々に関節腔に湧出すれば、持続する関節炎が引き起され得ると考える

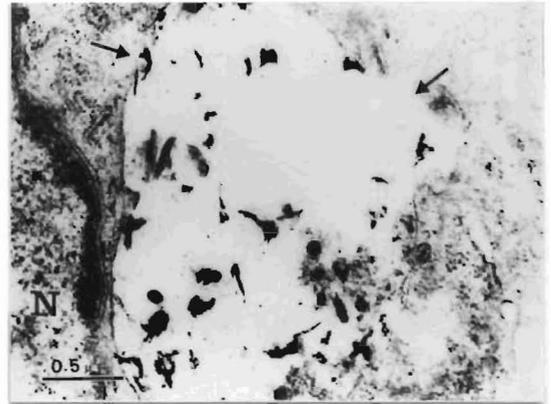


図14 限界膜が一部欠損して金粒子の減少したphagosome. N:核。

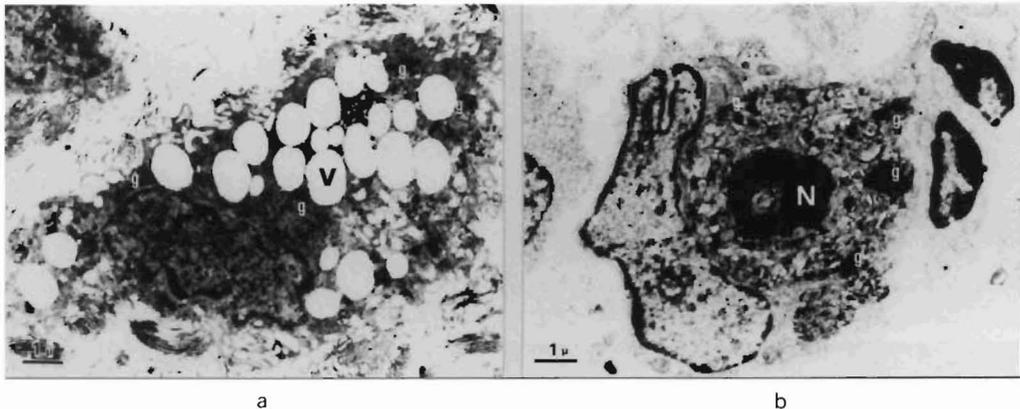


図15-a, b. 金粒子を含む細胞の変性. (a)多量金の粒子(g)を含む空胞変性(v)に臨むマクロファージ. (b)多核白血球に貪食された、金粒子(g)を持つ壊死細胞. N: pycnosisを起した核.

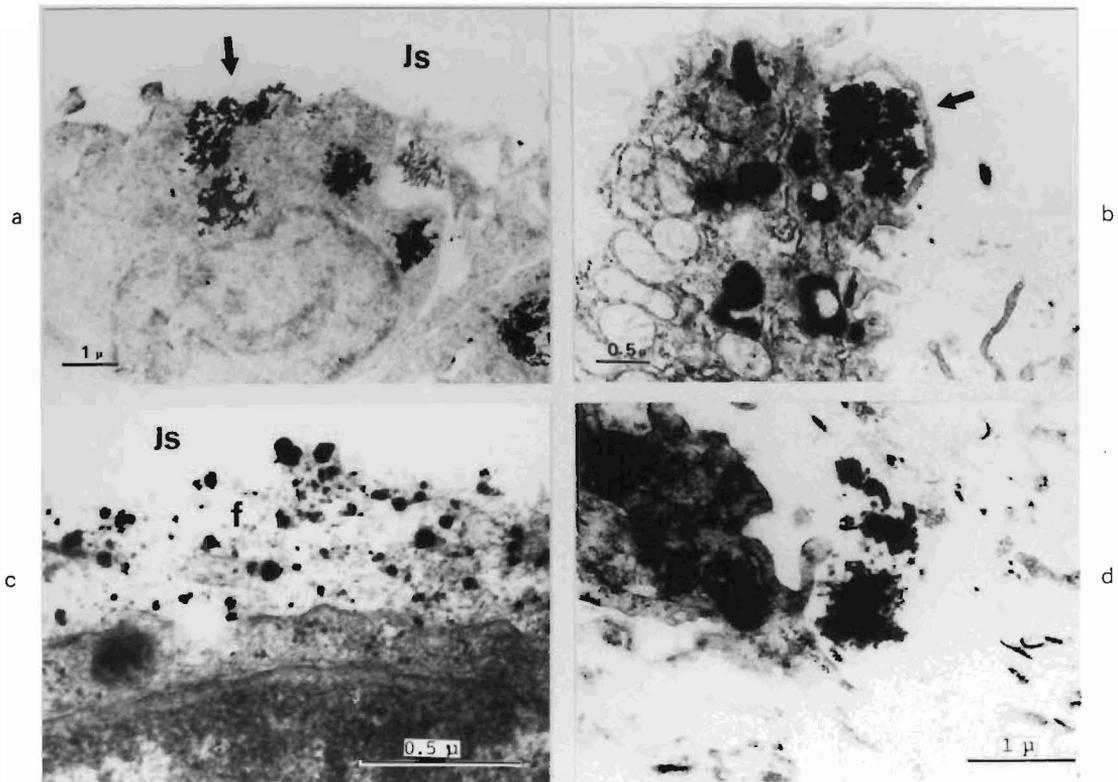


図16-a, b, c, d. 金塩の代謝。(a)exocytosisにより金粒子を関節腔に放出するIM型表層細胞。(b)endocytosisにより金粒子を取込むマクロファージ。(c)滑膜表面のフィブリノイド物質(f)内にも金粒子が認められる。(d)表層下組織の細胞間質にみられる金粒子。

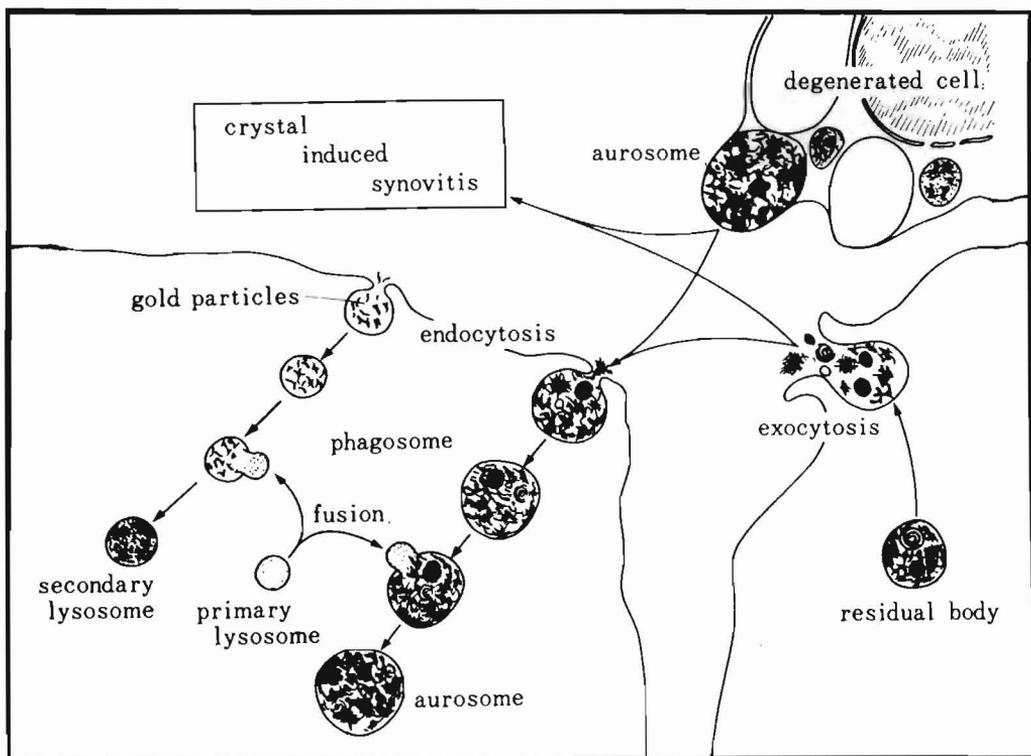


図17. 金塩の細胞内での代謝 (本文参照)

べきであろう。

マクロファージが免疫機構中で重要な役割を演じていることは周知のとおりである³⁴⁾。Ishikawaら²³⁾はRA滑膜の電顕観察を行い、血管周辺のtransitional areaのマクロファージとリンパ芽球のinteractionが免疫機構上、重要な働きをすると述べている。今回の検索でマクロファージは、表層下組織中の血管周辺に見られる炎症細胞集簇部位で、淡い顆粒状の蛍光抗体陽性物質を含む細胞として認められた。このマクロファージに接して、FITC陽性のリンパ芽球や形質細胞が存在することは、この部位での免疫反応の進行を示唆するものであり、重要な所見と考えられた(図4-c, d)。

症例7は、発症後長期間強い疼痛もないままに、ほとんど加療せずに過した症例である。関節痛が増強したために、試験切除を施行したところ、組織所見では多核白血球の浸潤が強く、Ig G、C₃がごく軽度認められるだけであった。なお関節炎の症状が増悪したために、試験切除後1ヶ月で滑膜切除が行われた。この時点では、表層細胞の増生と形質細胞の浸潤が高度になっており、Ig G、Ig Mの沈着が、表層細胞、形質細胞およびリンパ芽球に若干認められるようになっていた。滑膜局所での免疫反応の進行に伴った、関節炎増悪の症例であり、興味深い。

3. 金塩の局在および作用機序について

金療法を受けたRA患者の滑膜でNortonら^{35, 36)}およびGhadiallyら³⁷⁾は表層細胞に、Vernon-Robertら³⁸⁾やNakamuraら³⁹⁾は表層細胞と表層下組織中のマクロファージに、またInoue⁴⁰⁾や丘⁴¹⁾はこれに加えて、線維芽細胞への金粒子の沈着を観察している。またGhadially、Vernon-Robert、丘およびNakamuraらの研究ではX線マイクロアナライザーによる元素分析の結果、この粒子に金の含まれることが証明された。著者も今回の観察で、表層細胞、マクロファージ、線維芽細胞および細胞外の間質で金粒子を観察した。同様にX線マイクロアナライザーでの点・線・面の各モードによる分析で、これらに確かに金が含まれることを証明した(図13)。とくに表層下組織の血管周辺の炎症細胞が集簇する部位のマクロファージと、M型表層細胞のlysosomeやphagosomeに密に取込まれている所見が得られた(図10)。前述のように、血管周辺の炎症細胞が集簇する部位では、免疫反応が盛に行われており、また表層部ではimmune complexの沈着と湧出による、組織破壊が進んでいる場所であることを考え合わせれば、興味深い。すなわち、関節炎が惹起

される部位で、金塩が何らかのかたちで作用しておれば、まさに合目的である。

金塩が、免疫能を左右するかどうかという問題に対しては、抗体産生を抑えるとする説¹¹⁾と逆に促進するという相反する説¹²⁾があり、結論は出ていない。しかし最近安倍⁴²⁾はmitogenを用いたリンパ球の実験で、金を作用させたマクロファージを用いると、リンパ球のDNA合成を抑制することを示し、金塩の免疫反応抑制作用を説明した。そして形態学的な観察からすれば、この抑制作用は、lysosomal enzymeの働きが低下することによって、マクロファージの機能の低下を招来するものと考えられる。

もう一方の金塩取込みの中心である、M型表層細胞においてもやはり、金粒子はlysosomeとphagosomeに観察された。Persellinら⁸⁾やWegeliusら⁹⁾のlysosomal enzymeに関する研究や、このような形態学的な観察より、著者も金塩の作用発現の標的はlysosomeであろうという見解に賛同する。しかし、表層下組織の線維芽細胞にも若干の金の沈着が認められること(図3-a)から、金塩が結合織に作用するという説⁷⁾を完全に否定することはできない。

4. 金塩の滑膜内での代謝について(作用機序および関節炎増悪の機構)

前述のように、金粒子の電顕観察や元素分析による証明はよくなされてきたが、金塩の滑膜内での動態に注目した観察は非常に少ない。Nortonら³⁵⁾は関節内に注入された金コロイドの粒子が、関節腔表面のフィブリノイド物質に取込まれた後に、表層細胞に貪食されたり、細胞間を深層に侵入してゆく像を捉えた。しかしこれらが金そのものという確証はなく、その基剤だけかも知れない。またOryschakら⁴³⁾はaurothiomalateのrabbit膝関節腔への注入により、金粒子が軟骨細胞に貪食されて、coated vesicleとなり、primary lysosomeと融合することを観察した。ところが、これらの研究はいずれも、関節内に注入された金についての観察であり、全身的な金塩の投与後の、局所組織についてのものではない。

広畑および著者²⁰⁾は、M型表層細胞および表層下組織中のマクロファージに取込まれた、金粒子の種種相から、de Duveら⁴⁴⁾や小川⁴⁵⁾のlysosomeのlife cycleの模式図を参考にして、滑膜組織内における金塩の推移を推定した(図17)。すなわち、①金塩は筋肉内注射後、全身の関節組織に取込まれている。②必ずしもすべてのM型表層細胞やマクロファージに観察されるものではない。③金粒子が観察される細胞内でも、すべてのlysosomeやphagosomeには

認められない。④小さな lysosome や phagosome 内に観察されたり、いわゆる aurosome⁴³⁾として観察されるものや、時として明らかに大きな金粒子を貪食したと思われる細胞が見られる。⑤変性と壊死に陥っている細胞内にも多量の金粒子が取込まれている、などの事実より、電顕レベルで観察される、金塩の滑膜組織内での代謝を推定し、模式化してみた。図左のように、ある程度金塩が primary lysosome に取込まれた状態であれば、直接 lysosomal enzyme の作用を抑制したり、lysosomal membrane を安定化させて、¹⁰⁾ lysosomal enzyme の放出を防ぐので、消炎効果をもたらすと考えてよかろう。しかし細胞内に取込まれている、大きな種類の形態をとる多量の金粒子塊は、その細胞の一代中に徐々に長期間にわたって、貪食され融合したものと考へがたい。前述のように細胞が変性・壊死を起すことによって、継代的に細胞外への放出と貪食をくり返した結果、形成されたものと理解される(図17-中央～右側)。したがってこのような大きな金粒子塊は secondary lysosome 内に見られるような金粒子とは自と作用機序は異なり、金塩としての治療効果を発揮しえないと考えられる。それどころか、これら金粒子が細胞外に放出される時、同時に lysosomal enzyme も放出されるために、痛風などで発症すると同様の、いわゆる crystal induced arthritis^{46, 47, 48)}を誘発する場合もありうると推察した。

このような観点から、著者は今回の研究で一層詳しく、滑膜組織内での金粒子の態度を観察した。図11-aの中央に示されるように、金粒子を貪食した coated vesicle は、primary lysosome と融合して secondary lysosome となり、抗リウマチ作用を発揮するものと考えられる。しかし一方では、大きな aurosome (図11-b) や限界膜が一部欠損して、金粒子の少なくなった aurosome (図14) が観察されたり、金を多量に含み、変性に陥る細胞や、このような細胞を貪食した多核白血球も観察された(図15)。これらの aurosome や細胞から、金粒子が放出されることは容易に推測できる。事実、多量の金粒子がまさに関節腔に放出されようとしている所見(図16-a)や、細胞突起によって貪食された所見(図16-b)が得られた。また図16-c, dに示すように、滑膜表面のフィブリノイド物質内や、細胞外の間質にも金粒子が観察された。以上の所見より、我々が提唱した前述の、滑膜組織内における金塩の推移の模式図が、今回形態学的に証明されたわけである。

こりように関節炎の抑制と増悪といった、まったく逆の現象を引き起す金粒子は、一見形態学的に異

っているために、代謝の途中で、何らかの異った物質に変換されたのではないかという、疑問も生じてくるのである。しかし、分解能のすぐれた電子顕微鏡で高倍率の観察を行った結果、このような種類の形態をとる金粒子(図12-a, b, c, d)は、すべて6~13 μ mの微小顆粒が集積して形成されていることが明らかになった。取込みと放出をくり返すうちに徐々に集積して種類の形態をとるようになったものと考えられる。すなわち、形態や結合物質のちがいでによって、働きが異なるのではなく、あくまでも組織内での代謝によって、金塩が過剰となったために起きた現象であり、まったく逆の結果を引き起こす危険性があるものと考えられる。

5. 金塩の投与量および濃度について

金の血中濃度と臨床成績の間には関係があるとする説^{49, 50)}と、関係なしとする^{51, 52)}相反した二つの説が見られる。最近では血中濃度の問題に加えて、効果や副作用発現の観点から、大量使用の是非が検討されている。Sharpら⁵³⁾は週25mg 投与群と、この2倍以上の量を与え血中濃度が332 μ g/dlに保たれるようにされた群とを比較した。両者の間には効果に差はなく、血中濃度と効果の関係も見られなかったと述べている。同様にFurstら⁵⁴⁾は週50mg 投与群と150mg 投与群との間には、効果に差がないばかりか、後者では副作用が増加することを示した。また血中濃度と効果および副作用の関係も認めなかった。

今回の研究では、投与総量が2,000mgに達しないものでは、投与総量と血中濃度の間に相関関係が認められたものの、全体として見れば、有意な相関は示さなかった。これに反して、投与総量と滑膜中濃度には、安原¹⁸⁾の結果と同様に、正の相関関係が見られた。またOryschakら⁵⁵⁾は、関節内注入よりも、筋肉内注射による全身投与の方が、金粒子を含む大きな phagosome の出現頻度は少なく、反対に lysosome への沈着が増加すると述べているそして著者は、少量の投与例にも、組織学的に滑膜内への金塩の沈着を観察した。

ゆえに、金療法を開始して、効果が出たところでその血中濃度を一定レベルに保たなければならないとか、もっと投与してより一層の効果を得ようなどと考へて、むやみに大量投与することは意味がないといえる。そればかりか、投与総量が増加すれば、滑膜での金塩の蓄積量が増加して、過剰の金粒子による不必要な crystal induced arthritis が起り、効果的な治療が徒労に終りかねない。以上のことや、前述の金塩の滑膜内での代謝形態の観察結果を考へ

合せて、金治療を行なう際には、注意深い臨床症状の観察のもとで、少量を持続的に投与することが望ましい、との結論に達した。

V 結 語

1. 17例中19関節の classical rheumatoid arthritis の滑膜を用いて、蛍光抗体法による免疫病理学的検索を行うとともに、金塩の組織内での代謝を形態学的に観察し、金塩の作用機序について若干の考察を行った。

2. 滑膜炎の組織型分類ではⅠ型1例(5.9%)、Ⅱ型9例(52.9%)、Ⅲ型5例(29.4%)、Ⅳ型2例(11.8%)であった。

3. 金染色による顕微鏡観察で、金塩は主に表層細胞と表層下組織のマクロファージの細胞質に沈着していた。線維芽細胞や細胞外の間質にもわずかに観察された。

4. Ig G, Ig M は表層細胞と表層下組織の炎症細胞集簇部の形質細胞、リンパ芽球およびマクロファージの細胞質に高率に認められた。Ig M に比べて、Ig G の陽性所見は強くみられた。Immune complex は表層部と間質に主に存在した。

5. 顕微鏡観察で金粒子は、主に表層細胞とマクロファージの lysosome や phagosome に直径6~13 μ m の電子密度の高い微小顆粒の集積像として観察された。これらの粒子はX線マイクロアナライザーによる分析で、金を含有することが証明された。

6. 金塩が表層細胞やマクロファージの lysosome に作用することは RA の pathogenic mechanism の観点から、合目的的である。

7. 滑膜内での代謝形態から、金塩の作用機序と、金療法中に過剰な金粒子によって起るであろう crystal induced arthritis の発生機序について言及した。

8. 金塩投与総量と血中濃度の間に、有意な相関関係は見られなかった。しかし、投与総量が増加すれば、滑膜での金塩の蓄積は増加する傾向にあった。

9. 今回の研究成果から、RA に対する金療法では、注意深い観察のもとで、金塩の少量持続投与が重要なことを強調した。

稿を終るに臨み、終始懇篤な御指導を賜った、柏木大治名誉教授、広畑和志教授ならびに病理学京極方久教授に深甚なる謝意を表します。また文部技官 西海雅子嬢および整形外科教室・病理学教室諸兄のあたたかい御協力に感謝します。

金濃度の定量および解析を、公衆衛生学教室とシオノギ製薬に、金の微量分析を日立製作所に協力い

ただいたことを付記し、御礼申し上げます。

なお本研究の要旨は第21回日本リウマチ学会および第14回国際リウマチ学会で発表した。

文 献

- 1) Lande K : Die gunstige Beeinflussung schleimiger Dauerinfekte durch Solganal. Munchen Med Wchschr 74 : 1132, 1927
- 2) Freyberg RH : Gold therapy for rheumatoid arthritis. Arthritis and Allied Conditions (Hollander JL, McCarty, Jr. DL, ed) 8th ed, p455-482, Philadelphia, Lea & Febiger, 1972
- 3) Empire Rheumatism Council, Research Subcommittee : Gold therapy in rheumatoid arthritis. Final report of a multi-center controlled trial. Ann Rheum Dis 20 : 315, 1961
- 4) Mascarenhas BR, Grand JL, Freyberg RH : Gold metabolism in patients with rheumatoid arthritis treated with gold compounds - reinvestigated. Arthritis Rheum 15 : 391, 1972
- 5) Kling DH, Sashin D, Spanbock J : The mechanism of gold therapy in rheumatoid arthritis. J Lab Clin Med 24 : 1241, 1939
- 6) Bollet AJ, Shuster A : Metabolism of mucopolysaccharides in connective tissue. II Synthesis of glucosamine-6-phosphate. J Clin Invest 39 : 1114, 1960
- 7) Adam M : Investigation on the reaction of metals with collagen in vivo. 2 The formation of cross-links in the collagen of lathyritic rats after gold treatment in vivo. Eur J Biochem 3 : 411, 1968
- 8) Persellin RH, Ziff M : The effect of gold salt on lysosomal enzymes of the peritoneal macrophage. Arthritis Rheum 9 : 57, 1966
- 9) Wegelius O, Klockars M, Vainio K : Acid phosphatase activity in rheumatoid synovia. Acta Med Scand 183 : 549, 1968
- 10) Weissmann G : Lysosomes and the mediation of tissue injury in arthritis. Rheumatoid Arthritis (Muller W, Harwerth HG, Fehr K, ed) p141-154, London, Academic Press, 1971
- 11) Scheiffarth F, Baenkler H, Pfister S : The influence of gold on the kinetics of plaqueforming cells. Int Arch Allerg 40 : 117, 1971
- 12) Ebel R : The effect of gold on the pathogenetic mechanism of rheumatoid arthritis. Rheumatoid Arthritis (Muller W, Harwerth HG, Fehr K, ed) p617-630, London, Academic Press, 1971
- 13) Persellin RH, Hess EV, Ziff M : Effect of a gold salt on the immune response. Arthritis Rheum 10 : 99, 1967
- 14) 大坪謙吾 : 金塩の作用機序に関する研究 - 金塩の抗体産生能におよぼす影響を中心として - リウマチ 11 : 1, 1971
- 15) 大高裕一 : 慢性関節リウマチの病理形態。リウマチ (川上保雄、森崎直木、大高裕一編) 第2版 P142-163, 東京、医学書院、1973
- 16) Okamoto K, Akagi T, Mikami G : Biologische Untersuchungen des Goldes. 1. Mitteilung. Uber die histochemische Goldnachweismethode. Acta Scholae Med Kioto 22 : 373, 1939
- 17) 京極方久、森川茂 : 蛍光抗体法。新組織化学 (小川和朗、武内忠男、森富編) P103-123, 東京、朝倉書店、1975
- 18) 安原徳政 : 慢性関節リウマチの金療法 - とくに金の生体内推移について - 中部整災誌 15 : 917, 1972
- 19) Grahame R, Billings R, Laurence M, et al : Tissue gold levels after chrysotherapy. Ann Rheum Dis 33 : 536, 1974
- 20) 広畑和志、西林保朗 : 慢性関節リウマチに多量の金製剤は必要か? - 滑膜における金塩の電顕像とその意義。医学のあゆみ 99 : 808, 1976
- 21) 渡部忠雄、永谷隆 : 生物学におけるエネルギー分散型 X線分光法について [I]。細胞 6 : 53, 1974
- 22) 渡部忠雄、永谷隆 : 生物学におけるエネルギー分散型 X線分光法について [II]。細胞 6 : 75, 1974
- 23) Ishikawa H, Ziff M : Electron microscopic observations of immunoreactive cells in the rheumatoid synovial membrane. Arthritis Rheum 19 : 1, 1976
- 24) 広畑和志、水原貫城、居村茂明ら : 正常並に病的関節に於ける各組織の電子顕微鏡的研究、第1編 正常関節組織 (第1報)。日整会誌 36 : 871, 1963
- 25) 大高裕一 : 慢性関節リウマチの病理学的所見、内科シリーズNo19 慢性関節リウマチのすべて (鈴木秀郎編) P59-68, 東京、南江堂、1975
- 26) Muirden KD, Mills KW : Do lymphocytes protect the rheumatoid joint? Br Med J 4 : 219, 1971

- 27) Zvaifler NJ : The immunopathology of joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Adv Immunol* 16 : 265, 1973
- 28) Sliwinski AJ, Zvaifler NJ : In vivo synthesis of Ig G by rheumatoid synovium. *J Lab Clin Med* 76 : 304, 1970
- 29) Smiley JD, Sachs C, Ziff M : In vitro synthesis of immunoglobulin by rheumatoid synovial membrane. *J Clin Invest* 47 : 624, 1968
- 30) Tursi A, Trisio D, Bonomo L : An immunofluorescence mixed staining technique for detection of Ig G-rheumatoid factor and Ig G- β_2 C complexes in tissues. *Clin Exp Immunol* 6 : 767, 1970
- 31) 清水不二雄 : 病理組織におけるImmune Complex の検出と構成解析。 *日本臨床* 33 : 2732, 1975
- 32) Zvaifler NJ : Pathogenetic mechanisms in rheumatoid arthritis. *Arthritis and Allied Conditions* (Hollander JL, McCarty, Jr. DL, ed) 8th ed, p302-308, Philadelphia, Lea & Febiger, 1972
- 33) Ishikawa H, Ziff M : Electron microscopic demonstration of immunoglobulin deposition in rheumatoid cartilage. *Arthritis Rheum* 18 : 563, 1975
- 34) Bellanti SA : *Macrophages. Immunology.* Philadelphia, Saunders, 1971
- 35) Norton WL, Ziff M : Electron microscopic observation on the rheumatoid synovial membrane. *Arthritis Rheum* 9 : 589, 1966
- 36) Norton WL, Lewis DC, Ziff M : Electron-dense deposits following injection of gold sodium thiomalate and thiomalic acid. *Arthritis Rheum* 11 : 436, 1968
- 37) Ghadially FN, Oryschak AF, Mitchell DM : Ultrastructural changes produced in rheumatoid synovial membrane by chrysotherapy. *Ann Rheum Dis* 35 : 67, 1976
- 38) Vernon-Roberts B, Dore JL, Jessop JD, et al : Selective concentration and localization of gold in macrophages of synovial and other tissues during and after chrysotherapy in rheumatoid patient. *Ann Rheum Dis* 35 : 477, 1976
- 39) Nakamura H, Igarashi M : Localization of gold in synovial membrane of rheumatoid arthritis treated with sodium aurothiomalate. *Ann Rheum Dis* 36 : 209, 1977
- 40) Inoue H : A light and electron microscopic study of the distribution of gold sodium thiomalate in the rheumatoid synovial membranes. *Acta Med Okayama* 22 : 293, 1968
- 41) 邱松寿 : "金塩の細胞内局在について" 光顕並びに電顕的研究。 *リウマチ* 15 : 54, 1975
- 42) 安倍達 : RAにおける免疫反応と金製剤。 *リウマチ* 18 : 372, 1978
- 43) Oryschak AF, Ghadially EN : Aurosome in rabbit articular cartilage. *Virchows Arch, Abt B* 17 : 159, 1974
- 44) de Duve C, Wattiaux R : Functions of lysosomes. *Ann Rev Physiol* 28 : 435, 1969
- 45) 小川和朗 : ライソゾームの細胞化学。 *綜合臨床* 22 : 721, 1973
- 46) Weissmann G : Lysosomes and joint disease. *Arthritis Rheum* 9 : 834, 1966
- 47) McCarty DJ : Pathogenesis and treatment of the acute attack of gout. *Clin Orthop* 71 : 28, 1970
- 48) Hoffstein S, Weissmann G : Mechanisms of lysosomal enzyme release from leukocytes. IV Interaction of monosodium urate crystals with dogfish and human leukocytes. *Arthritis Rheum* 18 : 153, 1975
- 49) Lorber A : Application of serum gold determination for chrysotherapy. *Arthritis Rheum* 12 : 312, 1969
- 50) Krusius FE, Markkanen A, Peltola P : Plasma levels and urinary excretion of gold during routine treatment of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 29 : 232, 1970
- 51) Gerber RC, Paulus HE, Bluestone R, et al : Clinical response and serum gold levels in Chrysotherapy. *Ann Rheum Dis* 31 : 308, 1972
- 52) Rubinstein HM, Dietz AA : Serum gold. II Levels in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 32 : 128, 1973

- 53) Sharp JT, Lidsky MD, Duffy J, et al :
Comparison of two dosage schedules of
gold salts in the treatment of rheumatoid
arthritis. *Arthritis Rheum* 20 : 1179, 1977
- 54) Furst DE, Levine S, Srinivasan R, et al :
A double-blind trial of high versus conven-
tional dosage of gold salts for rheumatoid
arthritis. *Arthritis Rheum* 20 : 1475, 1977
- 55) Oryschak AF, Ghadially FN : Auosome
formation in articular tissues after
parenteral administration of gold. *J Path*
119 : 183, 1976