



Absence of Immunoglobulins in rheumatoid cartilage-pannus junctions

塩沢, 俊一

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1981-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0334

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000334>

※ 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。



氏名・(本籍) 塩 澤 俊 一 (大阪府)
 学位の種類 医 学 博 士
 学位記番号 医博い第325号
 学位授与の要件 学位規則第5条第1項該当
 学位授与の日付 昭和56年3月31日
 学位論文題目 **ABSENCE OF IMMUNOGLOBULINS IN RHEUMATOID
 CARTILAGE-PANNUS JUNCTIONS**
 慢性関節リウマチにおけるパヌスの侵入による
 関節軟骨上の免疫グロブリンの消失

審 査 委 員 主査 教授 浦 野 順 文
 教授 溝 口 史 郎 教授 杉 山 武 敏

・ 論 文 内 容 の 要 旨

慢性関節リウマチ(RA)の関節液や滑膜組織にはImmune complex(IC)が高率に存在している。このICは補体を消費して種々の免疫学的活性を発揮するが、RAにおいてはこのICが滑膜の炎症の慢性化に重要な役割を果たしている可能性がある。またICは滑膜組織のみならず関節軟骨の表面をはじめとする関節内組織に広く沈着している事が見出された。特に関節軟骨上にICが沈着する現象はRAに特異的であって、軟骨表面上のICが炎症滑膜組織であるパヌスを誘導し且つ活性化してその軟骨への侵入を助長する可能性が考えられ、事実ICを付着した組織を実験動物の滑液包中に埋めてやると、周囲にパヌス類似の慢性肉芽組織が形成された。そこで私共はヒトのRAの関節でパヌスによって被われた関節軟骨上のICの存在をペルオキシダーゼ標識抗ヒト免疫グロブリン抗体を用いて電子顕微鏡下に検索した。

方 法

手術によって得たRAの関節軟骨とパヌスに被われた関節軟骨を細切し、2%パラホルムアルデヒド、0.075 M リジン、0.01 M 過ヨウ素酸ナトリウムにて4℃2時間固定した。これをリン酸緩衝液で洗浄して、約50 μmに薄切した組織切片をペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト免疫グロブリン抗体と共にほぼ一晩染色した。これを少くとも24時間洗浄して、非特異的染色を洗浄した後に、この抗体の局在をジアミノベンチジン-H₂O₂反応(GrahamとKarnovskyの方法)によって調べた。組織切片は1%O₃O₄で1時間後固定をほどこしてからアルコール脱水を経てエポキシ樹脂に包埋した。

上記のペルオキシダーゼ反応による反応産物即ち免疫グロブリンの局在を電子顕微鏡下に検索した。

標識抗体の軟骨等の硬い組織への浸透性についてはコントロール実験を用いて最も硬い軟骨部分で少くとも20 μmの浸透を確認したので、観察に用いた超薄切片はすべて切断面から15 μm以内に

に限った。

更に手技上の問題点を克服するために、蛍光標識抗体法も用いて、同様の検索を行って、電子顕微鏡による所見の確認とした。

結 果

RAの5症例からの組織で検索を行ったが、パンススのない関節軟骨の表面には多量の免疫グロブリンの沈着が容易に認められたが、パンススに被われた軟骨部分には免疫グロブリンは認められなかった。ごく少量の染色を見逃さぬために検索はまず電子染色をほどこさずに行われ、その後に染色して形態の観察を行った。この検索はとりわけ、パンススの最先端で、比較的最近にパンススが軟骨に侵入したと考えられる軟骨部分に集中して行われたが、そのパンスス下においても免疫グロブリンを認めなかった。また軟骨へ侵入しているパンススの形態を観察すると、軟骨へ侵入している先端にある細胞はFibroblast型とMacrophage型に区別されたが、活性型細胞の大部分は多くの空胞と分泌顆粒をもち形態学的にMacrophageに近いと考えられた。また、この胞体に接する軟骨基質及びコラーゲンの消失が認められ、このMacrophage型細胞がその細胞突起を基質へ送り出し深く侵入している所見が得られた。以上の結果から、パンススの侵入部位では、侵入細胞はきわめて活発で、積極的に軟骨基質の破壊を行っている事がわかり、また関節軟骨の表面上に存在するICはパンススの侵入を受ける事によって消失すると考えられた。以上の結果は蛍光抗体法によって確認された。

考 察

ICがパンスス様の慢性肉芽組織を誘導し得る可能性について次の報告がある。SpectorとHeesonは抗体過剰か抗原抗体等量域のICをラットに注入して慢性肉芽組織を作っている。JasinとCookeは卵白抗原を関節内にくりかえして注入するウサギの実験的関節炎において、メニスクスに沈着したICが周囲に慢性炎症組織を誘導し得る事を示した。更にCookeらはヒトのRAにおいて免疫グロブリンや補体を始めとするICが関節軟骨表面上に沈着している事を見出した。従って、軟骨表面上に沈着したICパンススを誘起する原因となる可能性が考えられた。私共の研究の結果では関節軟骨に沈着しているICはひとたびパンススに被われると消失する事が示された。この場合、次の2つの可能性が考えられる。第1には軟骨表面がパンススによって被われる事によって、ICの軟骨面への沈着が妨げられた可能性。このとき、比較的最近パンススに被われたと考えられるパンススの先端部分ですらICを欠く事実から、パンスス下ではICは比較的早く代謝されてしまうと考えられる。次に第2の可能性として、パンススを構成する細胞がICをその消化酵素によって消化したり貪食したりした可能性。RAの滑液にコラゲナーゼや種々の蛋白分解酵素があって活性化されている事がよく知られている。私共の所見も、パンスス下で軟骨基質やコラーゲンが破壊されている事を示しており、加えて構成細胞がMacrophageに近い活発な形態を呈している事などは第2の可能性を強く支持する。しかし乍ら、実際これら2つの可能性は相反するものではなく、むしろパンススの侵入を受けた関節軟骨ではこの両者が同時に起っている事が想定される。

要 約

慢性関節リウマチ(RA)の関節軟骨表面に沈着したImmune complex(IC)はパンススの軟骨への侵

入に重要な役をなす可能性があるが、私共はパンス侵入下の軟骨におけるICの存在をペルオキシダーゼ標識抗体法を用いて電子顕微鏡下に検索した。RAの関節軟骨表面上には多量の免疫グロブリンが証明されたが、これに反してパンスの侵入を受けた軟骨にはこれが認められなかった。これは比較的最近パンスの侵入を受けたと考えられるパンスの先端部分でも同様であった。従ってRAにおいて関節軟骨の表面上に沈着しているICはひとたびパンスの侵入を受けると消失すると考えられた。この理由として活発なパンス組織によるICの消化や貪食の他に、パンスが被う事によるICの沈着の妨害などが考えられた。

論文審査の結果の要旨

免疫複合体は関節リウマチに於いて、関節軟骨の表面および関節液に存在する。また補体もリウマチ患者の罹患関節内で消費されている。これらの事実は、免疫複合体が関節リウマチの持続に重要な役割を演ずることを物語っている。この免疫複合体の関節軟骨上および関節靱帯上の存在と関節障害との関連は必ずしも明らかでない。リウマチ関節の際に見られるパンスは、障害された関節に対する反応なのか、関節炎の経過そのものなのか、あるいは障害に対して予防的に働いているかなど、免疫複合体との相互関係に於いての検索は未だ充分になされていない。この点を明らかにすべく、検索を試みた。

検索症例および方法

リウマチ血清反応陽性の5症例の関節リウマチの手術材料を用いた。軟骨・パンス接合部は全症例で、パンスのない関節を5例中3例で検索した。これらの外科材料は厚さ2mmの小切片とし、2%のパラホルマルデヒド・0.075 M リジン・0.01 M 過ヨウ素酸Na 混合固定液で固定し、これを50 μ mに薄切りし、ペルオキシダーゼを結合・抗ひと免疫グロブリン羊 γ グロブリンと室温で4時間、4°Cで1夜、更に室温で4時間反応させた。対照としてペルオキシダーゼ結合正常羊 γ グロブリンを同様に反応させた。燐酸緩衝液で洗浄後、ジアミノベンチジン・過酸化水素とpH 7.6で30秒反応させた後、1% O_3O_4 で4°C 1時間固定し、脱水後エボン812に包埋して電顕用ブロックを作成した。関節面に直角になるように、100nmの超薄切片を作成し、高電子密度の顆粒を見逃すことのないように無染色で観察した。更に酢酸ウラニウム・硝酸鉛で後染色し、もう一度観察した。ペルオキシダーゼ標識抗ひと免疫グロブリン羊 γ グロブリンは、パンス形成部、パンス形成のない軟骨面で、それぞれ少なくとも30 μ m、20 μ m 侵入することを確認したので、抗体の検出には50 μ mの厚さの切片で表面より15 μ m以下の部検索を行ったので、方法としては正しいと考える。軟骨・パンス接合部の検索は各々の症例で6~42部位、総計102部位、各々の部位で20超薄切切片を作って観察した。

4例では2%パラホルマルデヒド・0.075 M リジン・0.01 M 過ヨウ素酸ナトリウム混合液で固定後、10%ついで20%蔗糖液、蔗糖グリセロール混合液を通過後 ティッシュ・テックに包埋し、4 μ mの厚さに薄切りし、蛍光標識抗ひと免疫グロブリン羊 γ グロブリンを室温で2時間反応させて観察した。4症例で、各症例で2ないし12ヶ所の軟骨・パンス接合部、各部位について5切片を作成し、120切

片について観察した。

結 果

パンス形成のない軟骨表面では3症例全部に免疫グロブリンの存在が確認され、これは関節表面より9 μ m 部位にまで出現した。軟骨・パンス接合部では、パンスに覆われた部位では102切片のいずれにも免疫グロブリンは確認できなかった。この部位には空胞ライソゾームミトコンドリアに富み、粗面小胞体に乏しいマクロファージ様細胞と粗面小胞体に富む線維芽細胞様細胞が浸潤していた。蛍光抗体法では、パンス形成のない軟骨面の検索症例2例では免疫グロブリンが認められた。パンス・軟骨接合部では120切片中1例の2切片を除いては免疫グロブリンは証明されなかった。

考 案

うさぎの抗原誘発関節炎では、関節組織内の免疫複合体の周囲に関節炎が生じる。ひとでも抗体が関節の表面にある。ひとでも同様のことが想定される。パンスは免疫複合体の沈着によって惹起されるのか、また逆に組織内に免疫複合体の沈着を防ぐため、抗原や抗体の関節内へ侵入を阻止することが考えられる。この両者は決して排他的ではなく、共存することも考えられる。パンス周囲には軟骨基質および線維成分にも乏しい。また免疫グロブリンはパンス・軟骨境界部のすぐ内側でも消失していた。マクロファージに貪食されている免疫グロブリンも少い。これらの事実は、ライソゾーム酵素による細胞外の消化が短時間のうちに行われていることを物語る。これらの事実は免疫複合体がパンスの形成を惹起し、軟骨の破壊を来し、これが異物として更にマクロファージ様の細胞からライソゾーム酵素の放出を行わせ、炎症を持続させる可能性が大きいと考えられる。

本研究は関節リウマチについて、抗体とパンスの相互関係を電顕的ペルオキシダーゼ抗体法を用いて研究したものであるが、従来殆んど行われていなかった電顕レベルでの免疫組織学的検索で関節リウマチの成因について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって本研究者は医学博士の学位を得る資格があると認める。