— 原 著 —

慢性関節リウマチ患者におけるマクロファージ・ コロニー刺激因子の研究

河路 秀巳¹⁾・横室 公三¹⁾・菊池 京子¹⁾

素本 友紀³⁾・白井 康正²⁾

¹⁾日本医科大学微生物学免疫学教室

²⁾日本医科大学整形外科科学教室

³⁾森永乳業株式会社生物科学研究所

Macrophage colony-stimulating factor in patients
with rheumatoid arthritis

Hidemi Kawaji¹⁾, Kozo Yokomuro¹⁾, Kyoko Kikuchi¹⁾,
Youki Somoto³⁾ and Yasumasa Shirai²⁾

¹⁾Department of Microbiology and Immunology, Nippon Medical School

²⁾Department of Orthopaedic Surgery, Nippon Medical School

³⁾Biochemical Research Laboratory, Morinaga Milk Industry Co., Ltd.

Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) is a cytokine involed in the development and proliferation of the monocyte/macrophage lineage cells. M-CSF has also been reported to participate in the induction of osteoclasts, and may be important in the destruction of bone and cartilage and the periarticular osteoporotic changes seen in patients with rheumatoid arthritis (RA). We developed a new ELISA technique to measure M-CSF levels in synovial fluid with high sensitivity and reproducibility. The mean M-CSF level in the synovial fluid of patients with RA was 1.38 ± 0.56 ng/ml, and that of patients with osteoarthritis (OA) was 0.67 ± 0.13 ng/ml. In contrast, serum levels of M-CSF in patients with RA and in normal controls were 1.32 ± 0.50 ng/ml and 0.90 ± 0.09 ng/ml, respectively. These differences were both statistically significant.

Since serum M-CSF levels correlate with inflammatory signs obtained from examination of blood, they indicate the general condition of patients with RA. Synovial fluid M-CSF levels increase even in the early phase of RA and remain high despite drug therapy, which suggests that they reflect the condition of affected joints including joint spaces and inflamed synovia more directly than do the levels of serum M-CSF.

Measurement of the M-CSF level in the synovial fluid may be useful in the diagnosis, clinical evaluation, and assessment of the effects of treatment in patients with RA.

Key words: macrophage colony-stimulating factor, ELISA, rheumatoid arthritis, synovial fluid, serum

緒 言

Correcepndence to Hidemi Kawaji, Department of Microbiology and Immunology, Nippon Medical School, 1-1-5 Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

マクロファージ・コロニー刺激因子 (M-CSF) は, Stanley ら¹⁻⁵⁾によってヒトの尿中から発見さ

れたサイトカインである。このサイトカインは、単球やマクロファージ系細胞の分化、増殖に関する⁶⁾ほかに、脂質代謝の促進⁷⁾、単球による腫瘍細胞障害活性の増強^{8,9)}など多彩な生物活性を有している。さらに、最近骨大理石病の動物モデルである op/op マウスは、先天性に M-CSF を欠損するため、腹腔のマクロファージや破骨細胞が誘導されず、この破骨細胞誘導の障害により、歯芽の出芽や骨吸収に異常を生ずることが骨大理石病を惹起する原因となることが明らかにされた^{10,11)}。したがって、ヒト M-CSF を投与された op/op マウスでは、破骨細胞が誘導され、これらの異常が是正されることが報告¹²⁾されている。

慢性関節リウマチ (RA) の病因については、従来から多くの学説が提唱されてきたが、いまだに骨や軟骨におこる破壊の機序は解明されぬままである。その機序の一つにあげられる自己免疫現象では¹³⁾、抗原-抗体結合物の局所への集積と、それに伴う炎症性細胞の浸潤が、局所のサイトカイン¹⁴⁾や蛋白分解酵素¹⁵⁾を活性化し、病変が形成されるものと考えられている。しかしながら、不思議なことには、骨の破壊と関係の深い破骨細胞の誘導に直接関与する M-CSF と RA との関連についての報告はほとんどない。

われわれは、RA にみられる骨・軟骨の破壊や関節近傍の骨粗鬆化に、破骨細胞の誘導を介して M-CSF が関与する可能性を検討する目的で、関節液中の M-CSF 濃度を測定する新しい ELISA 法を確立した。この方法を用いて RA 患者および変形性関節症 (OA) 患者の関節液中の M-CSF 濃度を測定し、比較検討した。また、血清中の M-CSF 濃度も併せて測定した。

研究材料および方法

(1) 試薬および抗体

ヒアルロニダーゼ (生化学工業, EC 4.2.2.1, No. 100740, 100 TRU/ampoule, Japan) は、100 TRU/ml の濃度で蒸留水に溶解したものを使用した。

一次抗体、二次抗体および基準となるヒト M-CSF は、森永乳業株式会社生物科学研究所で作成したラット抗ヒト M-CSF モノクローナル抗体、

ウサギ抗ヒト M-CSF ポリクローナル抗体、およびリコンビナント・ヒト M-CSF (rhM-CSF) をそれぞれ使用した。これらの抗体は、rhM-CSF をそれぞれラットとウサギに免疫して作成したもので、モノクローナル抗体は IgG 1, ポリクローナル抗体は IgG 分画に精製したものである。抗体の認識部位についての検討はなされていない。

三次抗体は、peroxidase 標識ロバ抗ウサギ IgG 抗体 (Jackson Immuno Research, Peroxidase conjugated Affini Pure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L), No. 711-035-132, USA) を 20,000 倍に希釈して用いた。

検体に含まれる蛋白がプレート壁に付着することによって起こる非特異的反応を阻止するため、ゼラチン (BIO-RAD, EIA グレード, USA) を PBS で 0.5% の濃度に溶解しブロッキングに用いた。また、二次抗体と三次抗体の希釈にも PBS に溶解したゼラチン溶液を使用した。

界面活性剤は NP-40 (PIERCE, Nonidet P-40, Surfact-Amps P-40, No. 28324, USA), および Tween 20 (和光純薬工業, Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monolaurate No. 163-11512, Japan) を使用した。

発色基質には、TMB Microwell Peroxidase Substrate (Kirkegaard & Perry Lab. Inc., 50-76-04, USA) を使用した。その他の試薬はすべて特級品を使用している。

(2) 関節液の採取

関節液は、1987 年アメリカ・リウマチ学会改訂診断基準を満たす RA 患者 11 名 (Table 1) と、対照として X 線写真上 OA 所見を認め、膝関節水腫の存在した OA 患者 10 名 (50~83 歳, 平均 67.1 歳) の膝関節から治療の目的で穿刺、採取したものを使用した。関節液は採取後直ちに 10,000×g, 20 分間遠心して細胞成分を除去した。

(3) ヒアルロニダーゼ処理

細胞成分を除去した関節液 200 μ l にヒアルロニダーゼ 2 TRU/20 μ l と 10 mM 酢酸ナトリウム (pH 6.0) 80 μ l, 蒸留水 100 μ l を加え、55°C, 2 時間 incubate した。処理後の検体は、測定まで -80°C で凍結保存した。

Table 1 Profile of RA patients

cases	sex	age (yrs)	disease duration (yrs)	X-ray stage	class	DMARD used	steroid dose*(mg)	sample
1	F	47	4	III	2	BUC	5	SF & S
2	F	66	<1	II	2	BUC	(-)	SF & S
3	F	58	3	IV	3	BUC	5	SF & S
4	F	76	22	IV	4	D-PEN	(-)	SF & S
5	F	57	12	III	2	BUC	5	SF & S
6	F	53	1	III	2	BUC	(-)	SF & S
7	F	62	10	III	2	GST	(-)	SF
8	F	79	20	IV	2	GST	5	SF
9	F	34	<1	II	2	BUC	5	SF
10	M	55	5	III	2	BUC	(-)	SF
11	F	61	3	II	2	GST	(-)	SF
12	F	61	8	IV	2	BUC	(-)	S
13	F	70	3	II	2	BUC	5	S
14	M	53	1	II	3	(-)	(-)	S
15	M	59	3	II	2	BUC	(-)	S
16	F	45	11	IV	2	GST	(-)	S
17	M	45	1	I	2	BUC	(-)	S
18	F	74	2	II	2	BUC	(-)	S
19	F	56	3	II	2	BUC	(-)	S
20	F	46	12	IV	2	GST	(-)	S
21	F	42	2	II	2	D-PEN	(-)	S
22	M	49	8	IV	3	BUC	5	S
23	F	72	3	IV	2	LOB	(-)	S
24	F	58	3	III	2	BUC	(-)	S
25	F	45	1	I	2	BUC	5	S
26	F	47	12	IV	3	BUC	(-)	S
27	F	47	1	II	2	BUC	(-)	S
28	F	68	17	IV	4	BUC & LOB	5	S
29	F	62	8	II	1	(-)	(-)	S
30	F	50	1	II	2	D-PEN	(-)	S
31	F	35	6	IV	2	D-PEN	(-)	S
32	F	55	11	III	2	BUC	(-)	S
33	F	54	13	III	2	BUC	5	S
34	F	53	1	III	2	BUC	(-)	S

DMARD: disease-modifying antirheumatic drug, GST: gold sodium thiomalate, BUC: bucillamine, LOB: lobenzarit, D-PEN: D-penicillamine, SF: synovial fluid, S: serum,
*Steroid dose(mg) was converted in prednisolone.

(4) 血清の採取

上記基準を満たす RA 患者 29 名 (Table 1) と健康者 8 名 (森永乳業株式会社生物科学研究所のボランティア) から採血を行い、直ちに血清を分離し、関節液同様測定まで -80°C で凍結保存した。

(5) ELISA 法による M-CSF 測定

関節液および血清中の M-CSF 濃度を sandwich ELISA 法にて測定した。

96 穴 ELISA 用マイクロプレート (Nunc,

439454, Denmark) を用い、一次抗体 (ラット抗ヒト M-CSF モノクローナル抗体) を Dulbecco's PBS (以下 PBS) で最終濃度 0.1 $\mu\text{g/ml}$ に希釈し、100 $\mu\text{l/well}$ ずつ分注した。プレートシールテープで密閉し、4°C で一晩放置した後、0.05% Tween 20 を含む PBS (以下洗浄にはこれを用いる) でプレートを洗浄した。次に 0.5%ゼラチン溶液 200 $\mu\text{l/well}$ を加え、37°C, 1~2 時間湿潤チャンバー内に放置してブロッキングを行った。M-

CSF 基準溶液には, rhM-CSF を 0.5%ゼラチン溶液で希釈したものを使用した。関節液および血清は, 0.05%NP 40 を含む PBS で希釈し, 測定に供した。ブロッキング終了後プレートを洗浄し, 基準溶液ならびに検体溶液を $100\ \mu\text{l}/\text{well}$ ずつ加え, 密閉後, 37°C , 1 時間放置した。プレートを洗浄後, $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈した二次抗体 (ウサギ抗ヒト M-CSF 抗体) を $100\ \mu\text{l}/\text{well}$ ずつ加え, 再び 37°C , 1 時間放置し, プレートを再度洗浄後, HRP 標識ロバ抗ウサギ IgG 抗体を $100\ \mu\text{l}/\text{well}$ ずつ分注した。 37°C , 1 時間放置後プレートを洗浄し,

ELISA PROCEDURE

[A] SAMPLE PRETREATMENT

Synovial Fluids from Patients
↓
Centrifugation: $10,000 \times g$, 20min.
↓
Supernatant: $200\ \mu\text{l}$
+
Hyaluronidase (EC:4.2.2.1)
 $2\ \text{TRU}/20\ \mu\text{l}$
+
 $10\ \text{mM}$ Sodium Acetate (pH6.0)
 $80\ \mu\text{l}$
+
D.W. $100\ \mu\text{l}$
↓ 55°C , 2 hrs.
Stock (-80°C)

[B] MEASUREMENT OF M-CSF IN THE SYNOVIAL FLUID

anti M-CSF monoclonal Ab (rat)
↓
Blocking
↓
Sample
↓
anti M-CSF polyclonal Ab (rabbit)
↓
HRP-conjugated anti Rabbit IgG (donkey)
↓
Substrate
↓
O.D. at 450nm

Fig. 1 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) procedure for measurement of M-CSF level.

[A] Sample pretreatment, [B] Measurement of M-CSF in the synovial fluid

TMB を $100\ \mu\text{l}/\text{well}$ ずつ分注した。室温で 30 分放置し, $1\ \text{M}$ リン酸溶液を $100\ \mu\text{l}/\text{well}$ ずつ添加し, マイクロプレート・リーダー (BIO-RAD, MICROPLATE READER, model 3550, USA) で $450\ \text{nm}$ の吸光度を測定した。検体は rhM-CSF による検量線の直線範囲になる条件下で測定した。以上の過程を Fig. 1 にまとめた。

(6) 血液検査における炎症反応およびリウマチ因子の測定

C 反応性蛋白 (C-Reactive Protein: CRP) と白血球数 (WBC) は日本医科大学付属病院中央検査部においてそれぞれラテックス凝集法, および自動血球計数器にて測定した。赤血球沈降速度 (以下赤沈; Erythrocyte Sedimentation Rate: ESR) は日本医科大学付属病院整形外科外来にて Westergren 法で測定した。また, リウマチ因子 (Rheumatoid Arthritis Passive Agglutination: RAPA) の測定は, 株式会社エスアールエル (Tokyo, Japan) に測定を依頼した。

結 果

1. M-CSF の測定に及ぼすヒアルロニダーゼ処理の影響

関節液は粘稠性が高く, 未処理の関節液を ELISA 法で測定すると, 不明の非特異反応や抑制反応が起こり, 正確に測定することが困難である。これは, Table 2 に示したように, 既知量の rhM-CSF を関節液に加え添加回収実験を行うと, 平均 62.9% の回収率しか得られないことから明らかである。しかし, ヒアルロニダーゼで関節液を前処理することにより, 添加した rhM-CSF の回収率は平均 102.0% と有意に上昇し ($p < 0.005$), 関節液中の M-CSF 濃度を正確に測定することが可能になった (Table 2)。

このヒアルロニダーゼによって M-CSF の性状に変化が起こるか否かを, ゲル濾過クロマトグラフィーを用いて検討したのが Fig. 2 である。rhM-CSF にヒアルロニダーゼを加えたものと, 対照として等量の緩衝液を加えたものをゲル濾過クロマトグラフィー [カラム: COSMOSIL ϕ $7.5 \times 600\ \text{mm}$ (ナカライテスク, Japan), 緩衝液:

Table 2 The effect of hyaluronidase treatment on M-CSF recovery rates

sample No.	before treatment (%)	after treatment (%)
1	91.3	99.2
2	52.1	95.9
3	83.6	99.2
4	79.3	89.9
5	24.8	112.6
6	30.4	103.6
7	80.3	109.8
8	48.4	112.6
9	97.1	110.1
10	44.6	100.4
11	32.3	86.9
12	90.1	103.6
Avg.	62.9	102.0*
S.D.	26.7	8.5

* $p < 0.005$: significant as compared with the control

0.2 M NaCl/0.02 M リン酸ナトリウム (pH 6.8), 流速: 0.5 ml/min] に流し, 得られた分画を ELISA 法で測定した結果, 分子量や抗原特異性に変化のないことが確認された (Fig. 2).

本法による測定感度は, 関節液, 血清ともに 8 pg/ml であった.

2. 関節液中の M-CSF の測定

RA 患者 11 名について, 関節液中の M-CSF 濃度を測定した結果, 0.77~2.83 ng/ml, 平均 1.38 ± 0.56 ng/ml であった. 一方, OA 患者 10 名の関節液中の M-CSF 濃度は 0.48~0.90 ng/ml, 平均 0.67 ± 0.13 ng/ml であり, RA 患者において有意に高値を示した ($p < 0.01$, Table 3).

3. 血清中の M-CSF の測定

RA 患者 29 名の血清中の M-CSF 濃度は 0.68~2.58 ng/ml, その平均は 1.32 ± 0.50 ng/ml であった. 健常者 8 名の血清中の M-CSF 濃度は, 0.81~1.00 ng/ml で, 平均 0.90 ± 0.09 ng/ml であり, 関節液と同様に RA 患者において有意に高値を示した ($p < 0.01$, Table 4).

また, 関節液中の M-CSF 濃度を測定した RA 患者の中で, 血清中の M-CSF 濃度を測定したものを, Table 3 に示した. これらの患者 6 名の血清

Fig. 2 Influence of the hyaluronidase treatment upon recombinant human M-CSF added to the synovial fluid.

○ : Sample with hyaluronidase treatment, ● : Sample without hyaluronidase treatment

Both samples were measured by ELISA.

Table 3 M-CSF level in the synovial fluid of RA patients and OA patients

RA patients (n=11)			OA patients (n=10)	
No.	synovial fluid	serum	No.	synovial fluid
1	2.83 (ng/ml)	1.43	1	0.74
2	0.77	2.57	2	0.62
3	1.60	N.D.	3	0.60
4	1.52	N.D.	4	0.76
5	1.27	1.32	5	0.72
6	1.55	1.82	6	0.48
7	0.81	0.77	7	0.90
8	1.28	1.49	8	0.79
9	1.22	N.D.	9	0.59
10	1.28	N.D.	10	0.52
11	1.10	N.D.		
Mean	1.38*	1.57	Mean	0.67
S.D.	0.56	0.60	S.D.	0.13

N.D. : not done, *p<0.01 : significant as compared with the control

中の M-CSF 濃度は、0.77~2.57 ng/ml、平均 1.57±0.60 ng/ml であった。

4. 関節液中の M-CSF 濃度と血液検査所見との関連

RA 患者の関節液中の M-CSF 濃度と、白血球数および CRP、赤沈、リウマチ因子 (RAPA) な

Table 4 M-CSF level in the serum of RA patients

RA patients (n=29)		normal control (n=8)	
No.	serum level	No.	serum level
1	0.93 (ng/ml)	17	0.81
2	1.35	18	2.58
3	1.69	19	1.64
4	1.46	20	0.72
5	0.73	21	1.29
6	1.06	22	1.24
7	1.43	23	0.77
8	1.43	24	1.20
9	1.27	25	0.77
10	1.20	26	1.82
11	0.68	27	1.32
12	1.75	28	2.57
13	1.27	29	2.01
14	0.84		
15	0.87	Mean	1.32*
16	1.49	S.D.	0.50

*p<0.01 : significant as compared with the control

どの値との関連を Fig. 3 に示した。CRP 値、赤沈値と関節液中の M-CSF 濃度との間には相関は認められず、RAPA 値と白血球数のみが正の相関を示した。相関係数は各々 0.58 と 0.82 であった。

5. 血清中の M-CSF 濃度と血液検査所見との関連

RA 患者の血清中の M-CSF 濃度と、白血球数や CRP、赤沈、リウマチ因子 (RAPA) などの値との関連を Fig. 4 に示した。RAPA 値、CRP 値、赤沈値、白血球数と血清 M-CSF 濃度との間に、弱いながらもそれぞれ正の相関が認められた。各々の相関係数は 0.52, 0.62, 0.49, 0.44 であった。

6. 関節液中の M-CSF 濃度の経時変動

一人の患者について、経時的に関節液中の M-CSF 濃度を測定し、臨床症状の推移と比較検討した (Fig. 5)。経過中の二つの時点における血液検査所見を Fig. 5 中に示した。非ステロイド性消炎鎮痛剤、注射用金製剤、経口および関節内へのステロイド剤の投与などにより、朝のこわばり、疼痛、腫脹、熱感などの自他覚所見上は改善が認められ、Steinbrocker による Class 分類も 3 から 2 へと改善された。血液検査でも CRP 値は 5.6 mg/dl から 0.3 mg/dl へ、赤沈値も 65 mm/hr から 40 mm/hr へとそれぞれ低下したにもかかわらず、RAPA 値のみは 160 倍から 320 倍と依然高値を保持し、関節液中の M-CSF 濃度も、1.13 ng/ml から 2.04 ng/ml の間の高い値を維持していた。

考 察

一次抗体にモノクローナル抗体を使用して特異性を高めるとともに、ヒアルロニダーゼ処理によって、M-CSF を修飾することなく関節液の粘性を下げ、再現性の高い測定方法確立した。本法は放射性物質を必要としない点においても、その簡便性や安全性で優れた方法である。

RA 病変の主体である滑膜組織に、M-CSF の mRNA が発現していることを 1988 年、Firestein ら¹⁶⁾が報告し、1993 年 Hamilton ら¹⁷⁾も、培養滑

Fig. 3 Correlation between the M-CSF level in the synovial fluid and findings of blood examination.

Each graph correlates with ; a : ESR, b : CRP, c : RAPA, d : WBC count.

膜線維芽細胞に M-CSF の mRNA と蛋白の存在することを報告している。今回観察された関節液中の M-CSF 濃度の上昇も、その一つの原因は、RA による慢性滑膜炎によって増殖した線維芽細胞

胞様滑膜細胞 (Type B 滑膜細胞) によるものと思われる。さらに、1993 年に Campbell ら¹⁸⁾は、関節軟骨組織および軟骨細胞も M-CSF を産生することを報告した。増殖した滑膜細胞、関節軟骨や

Fig. 4 Correlation between the M-CSF level in the serum and findings of blood examination.

Each graph correlates with ; a : ESR, b : CRP, c : RAPA, d : WBC count.

軟骨細胞などの産生する M-CSF が、関節腔内に放出され、関節腔と連続している骨髓腔¹⁹⁾の破骨細胞を直接誘導するほか、サイトカイン・ネットワークを介して、局所にさらに多くの炎症性サイ

トカイン¹⁴⁾や蛋白分解酵素、活性酸素など¹⁵⁾の産生を誘導し、関節の破壊や骨粗鬆化に関与していることが考えられる。一方、Fig. 4 に示したように、RA 患者血清中の M-CSF 濃度は、血液検査で

Fig. 5 Modulation of the M-CSF level in the synovial fluid and findings of blood examination.

Fig. 6 Comparison of the M-CSF levels in the synovial fluid with that in the serum (see Table 3).

Patients are described as Pt. 1 to Pt. 6.

測定される炎症反応と正の相関を示した。血清中の M-CSF 濃度の上昇は、関節局所の M-CSF 産生の増大のほかに、全身の炎症疾患でもある RA によって、関節局所以外の M-CSF 産生が亢進する結果によるものと思われる。

Table 4 に示したように、RA 患者の血清中の M-CSF 濃度は、健常者の血清中の M-CSF 濃度と比較して有意に高値を示したが、個々の値を見ると、RA 患者 29 例中 8 例 (27.6%) において健常者の平均値を下回っていた。一方、RA 患者の関節液中の M-CSF 濃度は、関節液を採取することの出来る OA 患者を対照として比較すると、有意に高値を示すばかりでなく (**Table 3**)、全例で OA 患者の平均値を上回っていた。このことは、血清に比べ関節液の M-CSF 値が、RA 患者の局所の状態とより密接に関連することを示すものと思われる。

関節液と血清の両者の M-CSF 濃度を測定した 6 例 (**Table 3**) について、グラフ化したものが **Fig. 6** である。ここでも患者 5 (Pt. 5) は血清の測定値が健常者の平均値を下回っていたが、関節液中の M-CSF 濃度は、すべて対照の OA の平均値を上回っていた。なお、**Fig. 6** において患者 1 (Pt. 1) と患者 6 (Pt. 6) の 2 例では、他の 4 例と異なり関節液と血清の測定値が大きく違っていた。この相違が何に由来するかは、臨床症状や血液検査所見などから明らかにすることはできなかった。

血清中の M-CSF 濃度は、健常者ではほとんど変動しないことを、1993 年 Aihara ら²⁰⁾が報告している。一方、感染症や造血系および女性生殖器の悪性腫瘍で、その値の上昇することが報告されている²¹⁻²³⁾。RA 患者においては、血清 M-CSF の測定値がばらつく。**Fig. 4** に示すように、RA 患者の血清 M-CSF は、血液検査における炎症反応と相関し、全身的な炎症の活動性と平行している。したがって、血清中の M-CSF 値がばらつく理由は、M-CSF の起源が関節局所に限らず多様であり、治療に用いた各種薬剤の影響もさまざまであることも一因と考えられる。例えば、ステロイド剤については M-CSF 産生を刺激するとするもの¹⁷⁾と、反対に抑制するとするもの¹⁸⁾があり、M-CSF を産生する組織によってもステロイド剤に対する反応性が異なる可能性があって、複雑な RA の病態とともに、ばらつきの原因の一つとなるとと思われる。

一方、関節液では、RA 患者は例外なく M-CSF 濃度が高値を示した。今回調べた RA 患者では、罹患年数と血清および関節液中の M-CSF 濃度との間に相関が認められなかったこと (data not shown)、さらに、時間経過や治療によらず、関節液中の M-CSF 濃度が高値を示した患者の例 (Fig. 5) や、Table 1 で、罹病期間が 1 年以内の患者においても関節液内の M-CSF が上昇している例 (Pt. 2) があることから、関節液内の M-CSF は、病初期から増量することが考えられる。さらに抗リウマチ剤 (DMARDs: Disease-Modifying Antirheumatic Drugs) は、RA 患者の日常生活動作および血液検査所見を改善するが、関節破壊の進行には無効であるという Paulus ら²⁴⁾の報告が正しいとすれば、関節では薬剤などの影響を受けずに、滑膜線維芽細胞や軟骨細胞など複数の細胞群が M-CSF を産生し続ける結果、関節液の M-CSF 濃度が高値を持続するものと思われる。このことが、RA に特徴的な進行性の関節破壊に関与すると考えると、関節液中の M-CSF の測定、M-CSF 抑制の治療は、RA 患者の新しい診断と治療に重要な意味を持つてくる。さらに、自己抗体の一種であるリウマチ因子は、血清に比べ関節液中の M-CSF 濃度と強い正の相関を示す (Fig. 3c)。このことは、リウマチ因子と抗原との結合物の局所への沈着が、RA の慢性滑膜炎と引き続いて起こる関節破壊の原因であるとする従来からの考えを解明する新しい手がかりとなるかも知れない。さらに、関節液中の M-CSF 濃度が、血清中の M-CSF 濃度よりも末梢血中の白血球数と強い正の相関を示すこと (Fig. 3d, 4d) は、関節腔内に大量に存在する M-CSF が、近接する骨髓腔に移行し、骨髓における白血球の分化、増殖にも影響を及ぼす結果と考えられる。

以上、関節液と血清の M-CSF 濃度には、その病態の指標として差があると思われる。すなわち、M-CSF 濃度を RA の診断や病勢の判定に用いる場合、血清中の値は、全身的な炎症の活動性の反映であり、関節液中のそれは、RA の主病変である関節局所の炎症の活動性とより密接に関連するものと考えられる。したがって、関節液の M-CSF 濃

度は、関節破壊の進行の予測などにより有用な指標となるものと思われる。

また、今回データは示さなかったが、尿中の M-CSF 濃度は、健常者においても個体間のばらつきが大きく、RA 患者と健常者の間に有意差は認められなかった。

結 論

関節液中の M-CSF 濃度を測定する高感度で、再現性の高い方法を考案した。この方法を用いて、RA 患者の関節液中の M-CSF 値が OA 患者に比し、有意に高値であることを見出した。血清中の M-CSF 値も RA 患者の方が健常者よりも高値を示すが、個体差が大きく信頼性に欠ける結果であった。

本法は RA の診断、局所病態の推測と、治療による修飾の有無を知る新しい方法として評価し得るものと考えている。

稿を終えるにあたり、本研究に際しご協力いただきました日本医科大学微生物学免疫学教室、整形外科科学教室の諸先生方、ならびに森永乳業株式会社生物科学研究所、川島拓司先生、原田義次先生ほかの諸先生方に深謝致します。

なお、本論文の一部は第 23 回日本免疫学会 (1993 年 11 月)、ならびに第 23 回東日本リウマチの外科研究会 (1994 年 8 月) において発表した。

文 献

- 1) Robinson, W.A., Stanley, E.R., and Metcalf, D.: Stimulation of bone marrow colony growth in vitro by human urine. *Blood*, 33, 396~399, 1969.
- 2) Robinson, W.A., and Metcalf, D.: Factors in leukemic serum and urine stimulating bone marrow colony growth in vitro. *Proc. Amer. Ass. Cancer Res.*, 9, 60, 1968.
- 3) Stanley, E.R., Robinson, W.A., and Ada, G.L.: Properties of the colony stimulating factor in leukemic and normal mouse serum. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 46, 715~726, 1968.
- 4) Metcalf, D., and Stanley, E.R.: Quantitative studies on the stimulation of mouse bone marrow colony growth *in vitro* by normal human urine. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 47, 453~466, 1969.
- 5) Stanley, E.R., and Metcalf, D.: Partial purification and some properties of the factor in normal and leukemic human urine stimulating mouse bone marrow colony growth *in vitro* *Aust. J. Exp. Biol.*

- Med. Sci., 47, 467~483, 1969.
- 6) Stanley, E.R., Hansen, G., Woodcock, J., and Metcalf, D.: Colony stimulating factor and the regulation of granulopoiesis and macrophage production. *Fed Proc.*, 34, 2272~2278, 1975.
- 7) Motoyoshi, K., and Takaku, F.: Serum cholesterol-lowering activity of human monocytic colony-stimulating factor. *Lancet* ii, 326~327, 1989.
- 8) Suzu, S., Yokota, H., Yamada, M., Yanai, N., Saito, M., Kawashima, T., Saito, M., Takaku, F., and Motoyoshi, K.: Enhancing effect of human monocytic colony-stimulating factor on monocyte tumoricidal activity. *Cancer Res.*, 49, 5913~5917, 1989.
- 9) Suzu, S., Yanai, N., Saito, M., Kawashima, T., Kasahara, T., Saito, M., Takaku, F., and Motoyoshi, K.: Enhancement of the antibody-dependent tumoricidal activity of human monocytes by human monocytic colony-stimulating factor. *Jpn. J. Cancer Res.*, 81, 79~84, 1990.
- 10) Yoshida, H., Hayashi, S., Kunisada, T., Ogawa, M., Nishikawa, S., Okamura, H., Sudo, T., Shultz, L.O., and Nishikawa, S.: The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature*, 345, 442~443, 1990.
- 11) Wiktor-Jedrzejczak, W., Bartocci, A., Ferrante, A. W., Jr., Ahmed-Ansari, A., Sell, K.W., Pollard, J.W., and Stanley, E.R.: Total absence of colony-stimulating factor-1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 4828~4832, 1990.
- 12) Kodama, H., Yamasaki, A., Nose, M., Niida, S., Ohgame, Y., Abe, M., Kumegawa, M., and Suda, T.: Congenital osteoclast deficiency in osteopetrotic (op/op) mice is cured by injection of macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.*, 173, 269~272, 1991.
- 13) 安倍 達: 慢性関節リウマチ; 病因と免疫異常. 最新医学, 41, 1999~2003, 1986.
- 14) Zvaifler, N.J., and Firestein, G.S.: Cytokines in chronic inflammatory synovitis. *Scand. J. Rheumatol. Suppl.*, 76, 203~210, 1988.
- 15) Ahmadzadeh, N., Shingu, M., and Nobunaga, M.: The effect of recombinant tumor necrosis factor- α on superoxide and metalloproteinase production by synovial cells and chondrocytes. *Clin. Exp. Rheumatol.*, 8, 387~391, 1990.
- 16) Firestein, G.S., Xu, W.D., Townsend, K., Broide, D., Alvaro-Gracia, J., Glasebrook, A., and Zvaifler, N. J.: Cytokines in chronic inflammatory arthritis. I.; Failure to detect T cell lymphokines (interleukin 2 and interleukin 3) and presence of macrophage colony-stimulating factor in rheumatoid synovitis. *J. Exp. Med.*, 468, 1573~1586, 1988.
- 17) Hamilton, J.A., Filonzi, E.L., and Ianches, G.: Regulation of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) production in cultured human synovial fibroblasts. *Growth Factor*, 9, 157~165, 1993.
- 18) Campbell, I.K., Ianches, G., and Hamilton, J.A.: Production of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) by human articular cartilage and chondrocytes; Modulation by interleukin-1 and tumor necrosis factor α . *Biochim. Biophys. Acta*, 1182, 57~63, 1993.
- 19) 越智隆弘, 田辺鎮雄, 藤本真弘, 小野啓郎: 同種胸線細胞移植によるマウス多発関節炎における発症と増悪の原因. 臨床免疫, 23, 1419~1427, 1991.
- 20) 相原隆文, 三砂将裕, 花村卓司, 菊池 亮, 利光 央, 大谷博孝, 千葉省三, 江藤澄哉: 正常ヒト血清中の M-CSF レベルの日内および日差変動の検討. *Jpn. J. Clin. Pathol.*, 41, 268~272, 1993.
- 21) Cheers, C., Haigh, A.M., Kelso, A., Metcalf, D., Stanley, E.R., and Young, A.M.: Production of colony-stimulating factors (CSFs) during infection; Separate determinations of macrophage-, granulocyte-, granulocyte-macrophage-, and multi-CSFs. *Infect. Immun.*, 56, 247~251, 1988.
- 22) Hanamura, T., Motoyoshi, K., Yoshida, K., Saito, M., Miura, Y., Kawashima, T., Nishida, M., and Takaku, F.: Quantitation and identification of human monocytic colony-stimulating factor in human serum by enzyme-linked immunosorbent assay. *Blood*, 72, 886~892, 1988.
- 23) Scholl, S.M., Bascou, C.H., Mosseri, V., Olivares, R., Magdelenat, H., Dorval, T., Palangie, T., Validire, P., Pouillart, P., and Stanley, E.R.: Circulating levels of colony-stimulating factor 1 as a prognostic indicator in 82 patients with epithelial ovarian cancer. *Br. J. Cancer*, 69, 342~346, 1994.
- 24) Paulus, H.E., Scott, D.L., and Edmonds, J.P.: Classification of anti-rheumatic drugs; A new proposal. *Arthritis Rheum.*, 35, 364~365, 1992.

(受付: 1994年12月19日)