WORK SHOP

“Granuloma: Basic & Clinical”

リウマトイド結節構成細胞の解析

——滑膜細胞との比較——

村上一宏・沢井高志・京極方久*

Phenotypic and functional characterization of cells in rheumatoid nodule—Comparison with synovial cells

The “rheumatoid nodule”, which is a hallmark of systemic manifestation of rheumatoid arthritis and one of the typical “granulomatous” tissue reaction. In order to know the way to form such granuloma, we examined the rheumatoid nodules by the aid of enzyme-immunohistochemical technique. The characteristics of majority of cells composing of the inner palisading zone and outer granulation zone of rheumatoid nodule are quite similar to that of “D” cells which abundantly observed in the active stage of rheumatoid synovitis.

These “D” cell-like cells in rheumatoid nodule were phenotypically classified into two cell types; mononuclear phagocytic phenotype and mesenchymal phenotype, upon their staining characteristics to several marker specific monoclonal antibodies. The “D” cells will not be homogenous and will have at least two different origins. Clinically rheumatoid synovitis is characterized by its progressive and chronic destructive nature in contrast to subcutaneous nodule, which has transient and non-chronic nature. Histopathologically, in the rheumatoid nodule the lymphocytic infiltration was less conspicuous than that in rheumatoid synovium.

These findings suggest that lymphocyte infiltration, particularly CD 4 T lymphocyte, is essential for the continuation of chronic destructive inflammation, and will explain the difference between the subcutaneous nodule and synovitis; such as the former is transient and non-destructive, and on the other hand the latter is quite actively chronic and destructive.

Murakami Kazuhiro・Sawai Takashi・Kyogoku Masahisa*

key words: rheumatoid nodule, rheumatoid arthritis, granuloma, immunohistochemistry

リウマトイド結節は、慢性関節リウマチの関節外症状の一つとして重要なもので、RA 患者の10~30%に認められる¹⁾。結節は主として皮下に存在するが、しばしば肺、心、その他の内臓にも観察され、病理組織学的には中心部の壊死とそれを柵状に取り囲む類上皮の配列が特

徴となる肉芽腫の像を呈する。

血漿成分の血管外滲出と、それに対する炎症反応が、肉芽腫性病変形成の原因と考えられており、実際に結節中心部の壊死組織内には免疫グロブリンや補体の沈着が証明される^{1,2)}。リウマトイド結節構成細胞は、電顕的に組織球や線維芽細胞からなるとされ³⁾、細胞表面マーカーの検討では血液由来のマクロファージが浸潤していると考えられるものが多い^{4~6)}。また、RA 滑膜炎の増殖滑膜細胞とリウマトイド結節構成細胞の類似性を報告したものもあるが^{5,7,8)}、細胞の起源、病変の成り立ち、特に経時的变化などについては明らかでない点が多い。そこで本研究では、免疫組織学的にリウマトイド結節構成細胞を観察し、その分類ならびに病変の成り立ちについて考え、さらに滑膜細胞との比較を試みた。

材料と方法

リウマトイド結節は、慢性関節リウマチ診断基準（アメリカリウマチ学会、改訂案1987年）を満たす RA 患者5名の手背あるいは肘関節伸側皮下から、新・旧、大小いろいろなものを局所麻酔下で摘出した。摘出結節を直ちに分割し、一部は10%緩衝ホルマリンで固定し、他は急速凍結し保存した。ホルマリン固定標本からはパラフィン切片を作成、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い光顕的に観察し、凍結標本からクリオスタットで凍結切片を作成し、アセトンで固定後、Avidin: Biotinylated Enzyme Complex(ABC)法によって免疫染色を行った。免疫染色に用いた抗体はつぎのとおりである。anti HLA-DR, anti Leu M3(CD 14), anti Leu 4(CD 3), anti Leu 14 (CD 22), anti Leu 15 (CD 11b) (Becton-Dickinson), anti LCA(CD 45RB)(DAKO), anti FU 3 (福岡大学岩崎教授から供与を受ける)。

結 果

今回観察したリウマトイド結節の大部分は、中心部の壊死組織とそれを柵状に取り囲む細胞層および周囲の線維性肉芽病変からなる典型的な病理組織像を示していた(図1)が、比較的新しいものからやや陳旧性のものまで、いろいろな stage のものが観察された。肉芽組織部

* Department of Pathology, Tohoku University School of Medicine 東北大学医学部第一病理学教室

WORK SHOP

分では小血管の周囲を中心に多数の“星芒状細胞”が観察され、壊死を取り囲む柵状配列細胞とともに HLA-DR 抗原を強く発現していた(図2). 肉芽組織部分には T リンパ球の浸潤が軽度みられたが、B リンパ球や形質細胞の浸潤はほとんどなく、リンパ濾胞の形成なども認められなかった.

つぎに、このようなリウマトイド結節組織を、壊死組織を細胞が柵状に取り囲む部分(palisading zone), その周囲の細胞線維性の部分(intermediate zone), さらにその外層の小血管の存在部分(perivascular zone)の三つの部位にわけて、それぞれに出現する細胞を免疫組織学的に観察した(表1).

palisading zone は、前述のように壊死組織の周囲に多数の細胞が柵状に配列し、リウマトイド結節の最も特徴的な像となっている。壊死部分にフィブリン沈着のめだつ新しい時期の病変では palisading zone に、LCA, Leu M3, Leu 15 陽性, FU 3 陰性で、acid-phosphatase の産生を伴った胞体の豊かな類円形細胞が配列していた(図3). また、少数ではあるが好中球の浸潤も認められた。壊死部分がやや器質化しはじめる時期になると、類円形細胞に混じり星芒状細胞の出現が認められたが(図4), これらの細胞は単一種の細胞群ではなく、LCA, Leu M3 陽性, FU 3 陰性の細胞と、LCA, Leu M3 陰性, FU 3 陽性細胞の2種に大別された。これらの2種の細胞は、intermediate zone や perivascular zone にも連続して多数観察され、リウマトイド結節構成細胞の主体となるものであった(図5).

病変が陳旧化したものでは、palisading zone の類円形細胞はめだたなくなり、LCA, Leu M3 陰性で FU 3 が陽性の紡錘形細胞が増加していた(図6). また、intermediate zone には Leu 15 陽性細胞も観察されたがその数は少なく、染色性は palisading zone の Leu 15 陽性細胞にくらべると弱いものであった.

考 察

普通、病理組織学的にリウマトイド結節は、中心部の necrotic area, 壊死を取り囲む palisading zone, これらの外層の granulation tissue にわけられるが¹⁾, 今回は壊死を取り囲む palisading zone, 結節の外層にみられる perivascular zone, およびこれらの中間に位置する intermediate zone の3カ所にわけ、それぞれに存在する細胞を免疫組織学的に調べた。perivascular zone, intermediate zone, palisading zone, いずれにおいても HAL-DR 抗原陽性の“星芒状細胞”が多数出現して

図1 リウマトイド結節は中心壊死とそれを取り囲む細胞層および周囲の線維性肉芽性病変からなる。(HE, ×50)

図2 線維性肉芽性病変の血管周囲に出現する HLA-DR 抗原陽性の星芒状細胞(抗 HLA-DR 免疫染色, ×100)

り、リウマトイド結節の主要な構成細胞と考えられた。これらは古来、形態の上からは紡錘形ないし星芒状を呈し、いわゆる線維芽細胞に属するものと考えられ⁹⁾, 最近 HLA-DR 抗原やある種のマクロファージ系細胞マーカーが陽性となることから、血液由来のマクロファージと考えられてきたものである⁴⁻⁷⁾が、今回の検討で示すように、単一種の細胞からなるのではなく、LCA, Leu M3 陽性細胞と FU 3 陽性細胞の2種の細胞に大別される。

抗 LCA 抗体は正常、腫瘍細胞を問わず、血液細胞あ

WORK SHOP

表 1 phenotypic characterization of cellular component in rheumatoid nodule

	HLA-DR	LCA	Leu M3	Leu 15	FU 3
palisading zone					
macrophage derived cell	+	+	+	+	—
“D(F) cell” like cell	+	—	—	—	+
“D(M) cell” like cell	+	+	+	+	—
fibroblastic cell	+	—	—	—	+
intermediate zone					
“D(F) cell” like cell	+	—	—	—	+
“D(M) cell” like cell	+	+	+	+	—
fibroblastic cell	—	—	—	—	+
perivascular zone					
“D(F) cell” like cell	+	—	—	—	+
“D(M) cell” like cell	+	+	+	+	—
T lymphocyte	—	+	—	—	—
neutrophil	—	+	—	—	—

図 3 比較的新しいリウマトイド結節の palisading zone に認められる類円形細胞 (抗 Leu M3 免疫染色, ×100)

図 4 リウマトイド結節の palisading zone に出現する星芒状細胞 (抗 Leu M3 免疫染色, ×100)

るいはそれに由来する浸潤細胞に反応し¹⁰⁾, 抗 Leu M3 抗体は単球・マクロファージ系細胞の分化抗原とされ¹¹⁾, また, FU 3 抗体は非血液由来の局所間葉系細胞に反応するものである¹²⁾. したがって, LCA, Leu M3 陽性細胞は“血液由来”, FU 3 陽性細胞は“局所間葉系細胞由来”が示唆された. また, 滲出性変化の強い時期の palisading zone に認められた類円形細胞は, Leu 15 強陽性であり, acid-phosphatase 産生能もみられることなど, 血液単球由来のマクロファージの性格が強いことが

示された.

以上の結果から, 筆者らは, リウマトイド結節の成立機序を図 7 のように推測した. すなわち, なんらかの原因により, 血管外へ滲出してきたフィブリンあるいは免疫グロブリンに対して, まず, 血液由来のマクロファージが反応し, ついで局所の間葉系細胞群が動員され, 最終的には, 線維芽細胞の出現をみるという過程である. このように, リウマトイド結節構成細胞は複数種の細胞からなり, 血液由来細胞のほかには局所の間葉系細胞の関

WORK SHOP

図 5

星芒状細胞は、Leu M3 陽性(青色)と FU 3 陽性(茶色)の 2 種類に大別される。(抗 Leu M3, FU 3 免疫二重染色, $\times 200$)

与も重要であると考えられる。

このなかでも, perivascular zone から palisading zone の広い範囲にわたって認められた HLA-DR 抗原陽性の星芒状細胞は, RA 滑膜炎において増殖のめだつ sub-lining layer の D 細胞¹³⁾ にきわめて類似している。RA 滑膜炎にみられる D 細胞も, LCA, Leu M3 陽性細胞と FU 3 陽性細胞にわけられ, 前者は特に免疫学的活動性に関与し, 後者はその多彩な形態・機能特性から RA 滑膜炎の多彩な病像形成に係わっているものと考えられる^{14,15)}。

このように, リウマトイド結節構成細胞と滑膜構成細胞との間には高い類似性が認められるが, RA 滑膜炎は慢性・遷延性の長い経過をとり, 組織破壊性も強いのに対し, リウマトイド結節は一過性であり, 破壊性は示さないという大きな相違が認められる。その理由の一つとして, リンパ球の浸潤程度の差があげられる。すなわち, RA 滑膜炎では, リンパ濾胞の形成を伴ういちじるしいリンパ球浸潤が認められ, これらの T 細胞から産生される種々のサイトカインが少なからず滑膜細胞の動態に影響を及ぼしているものと考えられる¹³⁾のに対し, リウマトイド結節では, T リンパ球の浸潤が若干認められるだけで, B リンパ球や形質細胞はほとんど認められない。

図 6 やや陳旧化した時期のリウマトイド結節に出現してくる FU 3 陽性の紡錘形細胞 (FU 3 免疫染色, $\times 100$)

実際に, RA 滑膜炎では, 浸潤 T リンパ球は CD 4(+) の helper/inducer type のものが多いのに対し, リウマトイド結節に出現する T リンパ球には, 明らかな subset の特徴はみられない⁴⁾。したがって, リウマトイド結節では血管外に滲出したフィブリンや免疫グロブリン, 補体などに対するマクロファージ, あるいは滑膜 D 細胞に類似した細胞の非免疫学的反応と理解される。RA 滑膜炎では前述のように, T リンパ球の関与した免疫応答を基盤とした細胞間相互作用が病変形成の中心にあるが, フィブリンに対して滑膜細胞が増殖反応を示している像

WORK SHOP

図7 リウマトイド結節構成細胞の動態

もしばしばみられる¹⁶⁾。言い換えれば、リウマトイド結節は RA 滑膜炎の多彩な病像中の非免疫学的変化に共通するものかもしれない、リウマトイド結節構成細胞の解析は RA 滑膜炎の病像解明にも大きなヒントとなりうるものとする。

滑膜細胞には種々の protease の産生が認められ、組織破壊あるいは新生・再生に関連するものと考えられている^{17,18)}。滑膜細胞は *in vitro* の系でも IL-1 などの存在下に collagenase の産生亢進を示すことが知られており¹⁹⁾、滑膜細胞の protease 産生能も少なからずサイトカインの影響下にある。リウマトイド結節については、結節に由来する培養細胞に collagenase の産生能がみられたとする報告があるが²⁰⁾、*in vivo* における collagenase や他の protease 産生能については不明である。これらの点もまた、それぞれの病変を比較する際に興味をもたれ、今後より詳しい検討が必要と思われる。

文 献

- 1) Kaye, B.R., Kaye, R.L., Bobrove, A.: Rheumatoid nodules, Review of the spectrum of associated conditions and proposal of a new classification, with a report of four seronegative cases. *Am. J. Med.* 76: 279-292, 1984.
- 2) Fukase, M., Koizumi, K., Wakaki, K.: Histo-pathological analysis of sixteen subcutaneous rheumatoid nodules. *Acta Pathol. Jpn.* 30: 871-882, 1980.
- 3) Cochrane, W., Davies, D.V., Dorling, J., Bywaters, E.G.L.: Ultramicroscopic structure of the rheumatoid nodule. *Ann. rheum. Dis.* 23: 345-363, 1964.
- 4) Duke, O.L., Hobbs, S., Panayi, G.S., Poulter, L.W., Rasker, J.J., Janossy, G.: A combined immunohistological and histochemical analysis of lymphocyte and macrophage subpopulation in the rheumatoid nodule. *Clin. exp. Immunol.* 56: 239-246, 1984.
- 5) Athanasou, N.A., Quinn, J., Woods, C.G., McGee, J.O.D.: Immunohistology of rheumatoid nodules and rheumatoid synovium. *Ann. Rheum. Dis.* 47: 398-403, 1988.
- 6) Palmer, D.G., Hogg, N., Highton, J., Hessian, A., Denholm, I.: Macrophage migration within rheumatoid nodules. *Arthritis Rheum.* 30: 729-736, 1987.
- 7) Hedfors, E., Klareskog, L., Lindblad, S., Forsum, U., Lindahl, G.: Phenotypic characterization of cells within subcutaneous rheumatoid nodules. *Arthritis Rheum.* 26: 1333-1339, 1983.
- 8) Allen, C.A., Highton, J., Palmer, D.G.: Increased expression of p150,95 and CR3 leukocyte adhesion molecules by mononuclear phagocytes in the rheumatoid synovial membranes, Com-

WORK SHOP

- parison with osteoarthritic and normal synovial membrane. *Arthritis Rheum.* 32: 947-954, 1989.
- 9) Fassbender, H.G.: Pathology of rheumatic disease. Springer-Verlag, 1975.
 - 10) Kurtin, P.J., Pincus, G.S.: Leukocyte common antigen—A diagnostic discriminant between hematopoietic and nonhematopoietic neoplasms in paraffin sections using monoclonal antibodies *Hum. Pathol.* 16: 353-365, 1985.
 - 11) Dimitriu-Bona, A., Burmester, G.R., Waters, S.J., Winchester, R.J.: Human mononuclear phagocyte differentiation antigens. 1. Patterns of antigenic expression on the surface of human monocyte macrophage defined by monoclonal antibodies *J. Immunol.* 130: 145-152, 1983.
 - 12) Iwasaki, H., Isayama, T., Jhozaki, H., Kikuchi, M.: Malignant fibrous histiocytoma, Evidence of perivascular mesenchymal cell origin, Immunohistochemical studies with monoclonal anti-MFH antibodies. *Am. J. Pathol.* 128: 528-537, 1987.
 - 13) Kyogoku, M.: Pathology of immunopathological disease—Trials for analytical immunopathology—. *Tr. Soc. Pathol. Jpn.* 74: 13-60, 1985.
 - 14) Itoh, J., Ohyama, A., Murakami, K., Sawai, T., Nose, M., Kyogoku, M.: *In situ* localization of HLA-DR bearing T cells in the rheumatoid synovium demonstrated by dual-immunofluorescent staining. *J. Rheumatol.* (submitted).
 - 15) Murakami, K., Sawai, T., Kyogoku, M.: Morphological and functional characteristics of cultured human synovial cells obtained from the rheumatoid synovium. (in preparation).
 - 16) Fassbender, H.G.: Pathological system concept of rheumatoid arthritis. *Acta. Pathol. Jap.* 23: 431-438, 1973.
 - 17) Okada, Y., Nagase, H., Harris, E.D. Jr.: A metalloproteinase from human rheumatoid synovial fibroblast that digest connective tissue matrix component. *J. Biol. Chem.* 261: 14245-14255, 1986.
 - 18) Okada, Y., Takeuchi, N., Tomita, K., Nakanishi, I., Nagase, H.: Immunolocalization of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) in rheumatoid synovioblast (B cells): Correlation with rheumatoid arthritis. *Ann. rheum. Dis.* 48: 645-653, 1989.
 - 19) Dayer, J.M., Rochemonteix, B., Burrus, B., Demczuk, S., Dinarello, C.A.: Human recombinant interleukin stimulates collagenase and prostaglandin E₂ production by human synovial cells. *J. Clin. Invest.* 77: 645-648, 1986.
 - 20) Harris, E.D., Jr.: A collagenolytic system produced by primary cultures of rheumatoid nodule tissue. *J. Clin. Invest.* 51: 2973-2976, 1972.