各種抗リウマチ剤のサイトカイン産生能および

反応性に及ぼす影響——特に IL-1, IL-6——

橋本純子・佐藤和人^{*1)}, 檜垣 恵^{*2)}西岡久寿樹・柏崎禎夫^{*1)}宮坂信之^{*2)}

drug evaluation

炎症 VOL.11 NO.3
MAY 1991

The effects of antirheumatic drugs on the production of, and the responsiveness to cytokines (IL-1 and IL-6)

We examined the effects of antirheumatic drugs including cyclosporin A (CsA), bucillamine (SA 96) and salazosulfapyridine (SASP), on the production of, and the responsiveness to interleukin 1 (IL-1) and interleukin 6 (IL-6) and compared them to those of dexamethasone (DM).

Our study demonstrated that IL-1 production from human peripheral blood adherent cells was inhibited by antirheumatic drugs in the order of DM SA 96 CsA. There was no significant difference between normal controls and patients with rheumatoid arthritis with regard to the sensitivity to the drugs *in vitro*. Inhibitory effect of SASP was only elicited to rheumatoid adherent cells. IL-6 production was relatively resistant to the drugs examined, although significant but mild inhibition was observed. In contrast, the responsiveness to IL-1 and IL-6 was not affected by the drugs, except that DM augmented responsiveness to IL-6.

These data suggest that antirheumatic drugs might exhibit their antirheumatic action through inhibition of cytokine production including IL-1 and IL-6.

Junko Hashimoto・Kazuto Sato^{*1)}, Megumu Higaki^{*2)},
Kusuki Nishioka・Sadao Kashiwazaki^{*1)}, Nobuyuki Miyasaka^{*2)}

key words: interleukin 1, interleukin 6 cyclosporin A, bucillamine, salazosulfapyridine

慢性関節リウマチ (RA) の薬物治療には、従来より非ステロイド系消炎鎮痛剤が第一選択薬剤として用いられてきた。しかし、最近では、治療抵抗性 RA に対して各種抗リウマチ剤が使用され、好成績をあげている。

抗リウマチ剤は、別名、免疫調節剤 (immunomodulator), あるいは寛解導入剤 (disease modifying anti-rheumatic drug, DMARD) ともよばれ、本剤の投与により RA における滑膜増殖病変の進行が阻止することが可能である。その作用点は、免疫担当細胞であることが推測されているものの、その詳細な作用機序については不明の点も少なくない。

cyclosporin A (CsA) は、11個のアミノ酸からなる cyclic peptide であり、真菌由来の免疫抑制剤である。in vitro では、CsA はインターロイキン

2 (IL-2) の産生を強く抑制する¹⁾。CsA は、その強い免疫抑制作用より、臓器移植に際してみられる拒絶反応の抑制に用いられているが、近年では、RA の治療にも応用され、治療抵抗性の RA に対して臨床的有効性を発揮することが報告されている。

Bucillamine [SA 96 ; N-(2-mercapto-2-methylpropanoyl)-L-cysteine] は、本邦で開発された新しい抗リウマチ剤である。二つの SH 基を有しており、システインの誘導体である。すでに RA に対する有効性が二重盲検比較試験で確認されている²⁾。本剤の投与により、RA 患者において臨床症状の改善とともに、免疫グロブリンの正常化、リウマトイド因子の減少、T細胞サブセットの正常化、などの免疫学的パラメーターの改善することが明らかにされており、本剤は免疫系を介して、その抗リウマチ作用を発揮していることが推測されている。

salazosulfapyridine (SASP) は、5-aminosalicylic acid (5-ASA) と sulfapyridine (SP) が結合したアゾ化合物である。当初、北欧で RA の治療に用いら

^{*1)} Institute of Rheumatology, Tokyo Women's Medical College 東京女子医科大学リウマチ痛風センター

^{*2)} Division of Virology and Immunology, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University 東京医科歯科大学難治疾患研究所ウイルス・免疫疾患部門

れたものの、その後は、主として炎症性腸疾患の治療薬として広く用いられてきた。しかし最近になり、ヨーロッパを中心に RA に対する臨床試験が行われ、その有用性が再認識されるに至っている³⁾。作用点は腸管などのパイエル板などを含めた免疫系であることが推測されている。

一方、最近になり、RA における関節組織破壊の機序にサイトカインが深く関与していることが明らかにされている。筆者らは、すでにインターロイキン 1 (IL-1)、およびインターロイキン 6 (IL-6) が、炎症性滑膜組織より構成的に産生されていることを報告しており、これらの炎症性サイトカインが滑膜増殖や軟骨、骨破壊に関与しているものと推測している^{4,5)}。したがって、このような炎症性サイトカインの調節あるいは制御を行うことにより、RA における関節組織破壊を阻止する可能性も十分に考慮される。

本研究では、このような観点より、これらの抗リウマチ剤の IL-1 および IL-6 産生および反応性に及ぼす薬剤の影響について、すでに RA 治療にも用いられ、サイトカイン産生にも抑制的に作用することが明らかにされている副腎皮質ホルモン剤(デキサメサゾン)と比較検討を加えた。

対象と方法

(1) 対象

対象は、健康成人 8 名(男性 4 名、女性 4 名、平均年齢 32 歳)と、東京女子医科大学リウマチ痛風センターに通院する ARA 改訂診断基準を満たす RA 患者 8 名(男性 2 名、女性 6 名、平均年齢 50 歳)である。なお、RA 患者で副腎皮質ホルモンをプレドニゾン換算で 5 mg/day 以上、ペニシラミン 100 mg/day 以上の服用をしているものは、今回の検討から除外した。

(2) 細胞分離

ヘパリン加末梢静脈血より型のごとく Ficoll 比重遠心法により単核球分画(PBMC)を採取し、これをペニシリン 100 U/ml、ストレプトマイシン 100 μ g/ml、および 10% 胎児ウシ血清(Gibco 社、FCS)加 RPMI 1640 培地に再浮遊した。これをさらにペトリ皿(コースター社、9×9 cm)上にて 37°C 1 時間静置したのち、非付着細胞と付着細胞とにわけた。

付着細胞の回収は 0.025% EDTA(Sigma 社)と

ラバーポリスマンを用いて行った。非付着細胞および付着細胞分画中の単核の混入率あるいは純度は、エステラーゼ染色により、それぞれ約 5%、80%であることが確認された。

関節液は RA 患者膝関節よりヘパリン加チューブに採取したあと、1/10 量のスプレーゼ(持田製薬)を添加し、37°C 45 分培養し、上記のごとく Ficoll 比重遠心法により、単核球分画(SFMC)を採取した。

(3) 薬剤

CsA(サンド社より供与)、SA 96(参天製薬)、SASP(ファルマシア社)、デキサメサゾン・リン酸エステル(萬有製薬)である。

CsA の溶解は、dimethylsulfoxide(DMSO)を、SASP の溶解は NaOH を、それぞれ用いて行い、希釈系列は RPMI 1640 培地を用いて行った。SA 96 およびデキサメサゾンの溶解は、当初より RPMI 1640 を用いて行った。

(4) サイトカインの産生

非付着細胞からのサイトカイン産生は、10% FCS 加 RPMI 1640 で 1×10^6 /ml に調整したあと、phytohemagglutinin(PHA, Difco 社) 1 μ g/ml の存在下あるいは非存在下で 24 時間培養を行った。また、付着細胞の場合は 1×10^5 /ml に調整後、lipopolysaccharide(LPS, Sigma 社) 10 μ g/ml の存在下あるいは非存在下で 24 時間培養を行った。

なお、予備的検討により、これらマイトジェンの量は各サイトカイン産生において至適量であることを確認している。培養上清は 1,500 rpm で 10 分遠心することにより採取し、サイトカイン測定まで -70°C で凍結保存した。

(5) IL-1 活性の測定

IL-1 活性は A 375 悪性黒色腫細胞株(大塚製薬細胞工学研究所 平井嘉勝博士より供与)を用いる growth inhibition factor(GIF) assay により行った⁶⁾。

まず、A 375 細胞を平底 96 穴組織培養プレート(コースター社)に 1×10^4 /well ずつ分注、さらに各種濃度に調整した被検検体あるいはリコンビナント IL-1 β (大塚製薬)を 100 μ l 添加して 4 日間培養、その後 0.5% ニュートラルレッドを添加し、2 時間後、生細胞内に摂取されたニュートラルレッドをエタノールで抽出して、これを ELISA リ

ーダーを用いて波長 540 nm で測定した。

本アッセイの検出限界は、IL-1 β で 5~1,000 pg/ml (IL-1 α では 20 pg/ml~) であり、IL-2, IL-6, 腫瘍壊死因子(TNF α) とは交叉反応はみられなかった。

また、予備的検討において、従来より IL-1 アッセイに用いられてきたマウス胸腺細胞を用いる LAF アッセイや、IL-1・ELISA との間に良好な相関関係が認められている。

(6) IL-6 活性の測定

IL-6 活性の測定は、SKW 6-C1-4 細胞株(阪大細胞工学センター岸本忠三・平野俊夫両博士より供与)を用いて行った⁵⁾。

まず、SKW 6-C1-4 細胞 1 $\times$ 10⁵ 個を平底組織培養プレート内で各種濃度に調整した被検検体あるいはリコンビナント IL-6(味の素中央研究所より供与)とともに4日間培養し、培養上清中の IgM 量を ELISA 法により測定した。なお、この際に、被検検体中の IgM 量を培養上清中の IgM 量より差し引いて、培養上清中の IgM 量を算出した。

(7) IL-2 活性の測定

IL-2 活性の測定は、マウス IL-2 依存性細胞株(OCT-41, 大塚製薬細胞工学研究所より供与)を用いて行った。

まず、OCT-41 を 1 $\times$ 10⁵/ml に調整し、被検検体あるいはリコンビナント IL-2(武田製薬研究所より供与)と48時間培養し、DNA 合成能は MTT 法により測定した⁷⁾。

(8) 各種薬剤によるサイトカイン産生抑制効果の算出法

各種薬剤によるサイトカイン産生抑制率は、下式により算出した。

抑制率(%) = $\{1 - [\text{薬剤添加時のサイトカイン産生}(\text{マイトジェン刺激時} - \text{マイトジェン非刺激}) / \text{薬剤非添加時のサイトカイン産生}(\text{マイトジェン刺激時} - \text{マイトジェン非刺激})]\} \times 100$

(9) IL-1 および IL-6 反応性の測定

上記アッセイ系において、おのおのの指示細胞(IL-1 の場合は A 375 細胞, IL-6 の場合は SKW 6-C1-4 細胞)にリコンビナント IL-1 あるいは IL-6 を添加する際に、各種濃度に調整した薬剤を同時に添加し、これら細胞株の各サイトカインに対する反応性の変化について検討した。

表 1 サイトカイン反応性に対する各種薬剤の影響

薬剤	濃 度	IL-1 反応性 ^{*1)} に及ぼす影響 (%)	IL-6 反応性 ^{*2)} に及ぼす影響 (%)
CsA	1 μ g/ml	0	0
	0.1 μ g/ml	0	0
SA 96	10 ⁻⁵ M	0	0
	10 ⁻⁶ M	0	0
SASP	10 ⁻⁵ M	0	0
	10 ⁻⁶ M	0	0
DM	10 ⁻⁵ M	0	+256
	10 ⁻⁶ M	0	+210

*1) IL-1(500 pg/ml)を A375 細胞に添加する系に各種薬剤を添加し、4日間培養した際の IL-1 反応性の変化

*2) IL-6(5 U/ml)を SKW-CL4 細胞に添加する系に各種薬剤を添加し、4日間培養した際の IL-6 反応性の変化

(10) 推計学的処理

推計学的処理は、Student *t*-test を用いて行った。

結 果

(1) 各種サイトカイン産生に及ぼす抗リウマチ剤の影響——実験条件の検討

はじめに、サイトカイン産生時、すなわち PHA あるいは LPS などのマイトジェン刺激時に、同時に薬剤を共存させる方法について検討した。この方法では、培養上清中に抗リウマチ剤が含まれることになり、バイオアッセイにおいて薬剤がサイトカイン測定に影響を及ぼさないという前提が必要となる。そこで、IL-1 および IL-6 の測定系において、リコンビナント IL-1 あるいは IL-6 添加時に薬剤を共存させることにより、抗リウマチ剤のサイトカイン反応性に与える影響について検討した。

その結果は、表 1 に示すとおりである。この系において、CsA および SA 96 は、IL-1 あるいは IL-6 に対する反応性に影響を与えなかったが、デキサメサゾン IL-6 に対する反応性を有意に増強させた。したがって、今回の検討においては、サイトカイン産生時に薬剤を共存させる方法は、採用することを見合わせた。

また、予備的検討において、マイトジェン刺激一定時間後に抗リウマチ剤を加える系についても

表 2 抗リウマチ剤による IL-2 産生抑制効果*¹⁾

(a)				
	薬剤濃度 ($\mu\text{g/ml}$)			
	0.01	0.1	1	10
CsA	80.2 $\pm$ 10.6*	79.4 $\pm$ 6.1* ²⁾	78.3 $\pm$ 5.2*	80.2 $\pm$ 7.3*

(b)			
	薬剤濃度 (M)		
	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴
DM	95.3 $\pm$ 6.2*	98.3 $\pm$ 7.4*	98.2 $\pm$ 6.1*
SA 96	85.4 $\pm$ 7.6*	75.8 $\pm$ 8.8*	72.3 $\pm$ 10.5**
SASP	60.6 $\pm$ 15.8	72.5 $\pm$ 24.9	70.3 $\pm$ 8.3**

* P<0.001. ** P<0.02

*¹⁾ PHA 刺激 PBMC の IL-2 産生に対する各種薬剤の抑制効果*²⁾ mean $\pm$ SE%

検討を加えた。しかし、マイトジェン刺激24時間後に薬剤を添加した際には、サイトカイン産生は薬剤によってまったく影響を受けなかったことより(データ略)、この方法も今回の検討には不適当と考えた

そこで、まず薬剤によって24時間の前処理を行い、その後でサイトカイン産生のためのマイトジェン刺激を行う方法について検討を加えた。すでに CsA は、IL-2 産生に強い抑制作用を有することが判明しているため、CsA により正常人由来非付着細胞を24時間前処理したあと、ついで PHA で24時間刺激する系において、CsA の IL-2 産生に及ぼす影響について検討した

その結果、この方法においても、CsA は非付着細胞からの IL-2 産生を 0.01~10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度において、75% 以上抑制した(表 2 a)。しかし、CsA の溶解に用いた DMSO コントロールではまったく抑制がみられなかったことより、この抑制活性は CsA 自体によるものと思われ、この結果は、ほぼ既報に合致するものと考えられた。

さらに、デキサメサゾン、SA 96、SASP についても同様の検討を加えた(表 2 b)。その結果、いずれの薬剤も調べた濃度において強く IL-2 産生を抑制した。

以上より、本実験系を用いても、各種薬剤のサイトカイン産生に及ぼす効果を検討することは十分に可能と考え、本系を以後の実験において採用することとした。

(2) 各種薬剤のサイトカイン産生に及ぼす効果

表 3 CsA の (a) IL-1 産生、(b) IL-6 産生に及ぼす効果

(a)			
	薬剤濃度 ($\mu\text{g/ml}$)		
	0.1	1	10
NC・A* ¹⁾	31.7 $\pm$ 9.0*,*	29.5 $\pm$ 8.1*	33.1 $\pm$ 11.1*
RA・A* ²⁾	27.6 $\pm$ 7.0*	31.3 $\pm$ 8.6*	30.2 $\pm$ 10.0*

(b)			
	薬剤濃度 ($\mu\text{g/ml}$)		
	0.1	1	10
NC・NA* ³⁾	25.0 $\pm$ 4.5*	20.9 $\pm$ 4.7*	21.3 $\pm$ 3.6*
RA・NA* ⁴⁾	28.9 $\pm$ 8.1*	23.8 $\pm$ 6.0*	27.5 $\pm$ 6.8*
NC・A	31.5 $\pm$ 9.5*	30.3 $\pm$ 11.2*	25.5 $\pm$ 8.9*
RA・A	21.2 $\pm$ 2.5*	19.7 $\pm$ 4.7*	20.4 $\pm$ 6.7*

* P<0.05

*¹⁾ NC・A : LPS 刺激正常対照付着細胞*²⁾ RA・A : LPS 刺激 RA 患者付着細胞*³⁾ NC・NA : PHA 刺激正常対照非付着細胞*⁴⁾ RA・NA : PHA 刺激 RA 患者非付着細胞* mean $\pm$ SE%

(1) 末梢血由来細胞を用いる系

i. CsA : まず、CsA の正常人付着細胞からの IL-1 産生に及ぼす影響について検討した。その結果、CsA は IL-1 産生を 0.1~10 $\mu\text{g/ml}$ において、平均約 30% と有意の抑制効果を認めたが、IL-2 産生抑制効果に比して弱いものであった(表 3 a)。また、RA 患者付着細胞を用いた際にも、同様の傾向が認められた。

つぎに、CsA の IL-6 産生に及ぼす効果を、非付着細胞を PHA で、付着細胞を LPS で刺激する系において検討した。その結果、CsA は各濃度において、正常人非付着細胞および付着細胞からの IL-6 産生を有意に抑制したが、その抑制効果は平均20~30%前後と弱かった(表 3 b)。この傾向は、RA 患者由来の細胞を用いた際にもほぼ同様であった。

ii. SA 96 : SA 96 は、正常人付着細胞からの IL-1 産生についても 10⁻⁶ M をピークに平均30.4~44.6%の IL-1 産生抑制活性が認められた(表 4 a)。この傾向は RA 患者についても同様であり、RA 患者では 10⁻⁴ M をピークに平均 27.6~50.2% の IL-1 産生抑制がみられた。また、正常群と RA 患者群との間において、SA 96 の IL-1 産生抑制効果の

表 4 SA 96 の (a) IL-1 産生, (b) IL-6 産生に及ぼす効果

	(a)		
	薬剤濃度 (M)		
	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴
NC・A ^{*1)}	44.6±12.6*,**	43.2±8.4**	30.4±7.3*
RA・A ^{*2)}	27.6±11.1	34.6±13.9*	50.2±11.7**

	(b)		
	薬剤濃度 (M)		
	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴
NC・NA ^{*3)}	18.6±8.9	16.5±2.5*	21.8±7.0*
RA・NA ^{*4)}	22.2±4.3*	18.6±4.5*	23.4±2.8*
NC・A	16.6±3.3*	11.5±3.0*	18.0±4.3*
RA・A	33.1±2.7*	23.7±16.3	28.6±9.2*

* P<0.05. ** P<0.02

*¹⁾ NC・A : LPS 刺激正常対照付着細胞

*²⁾ RA・A : LPS 刺激 RA 患者付着細胞

*³⁾ NC・NA : PHA 刺激正常対照非付着細胞

*⁴⁾ RA・NA : PHA 刺激 RA 患者非付着細胞

* mean±SE%

有意差は認められなかった。

これに対して, IL-6 産生抑制効果は, 非付着細胞, 付着細胞いずれに対しても弱く, いずれの濃度においても15~20%前後の抑制活性がみられたにすぎなかった(表4b)。また, 正常群と RA 患者群との間に有意差はみられなかった。

iii. SASP : SASP は, 正常人からの LPS 刺激付着細胞 IL-1 産生については有意の抑制効果は認められなかった。これらに対して, RA 患者付着細胞からの IL-1 産生に関しては, 用量依存的に抑制効果がみられた(表5a)。

一方, SASP は正常人非付着細胞および付着細胞からの IL-6 産生を抑制したが, その抑制活性は最大約30%と弱いものであった。また, RA 患者非付着細胞からの IL-6 産生に対しては, 10⁻⁵~10⁻⁶ M においてやや強い抑制効果がみられた(表5b)。

iv. デキサメサゾン : IL-1産生に関しては正常群, RA 群のいかんにかかわらず, 比較的強い抑制効果が認められた(表6a)。

これに対して, デキサメサゾンは IL-6 産生に対しては, 他の薬剤と同様に, 最大約30%の抑制効果しか認めなかった。また, 正常群

表 5 SASP の (a) IL-1 産生, (b) IL-6 産生に及ぼす効果

	(a)		
	薬剤濃度 (M)		
	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴
NC・A ^{*1)}	0±8.9*	0±11.5	0±2.9
RA・A ^{*2)}	11.9±1.4*	21.6±6.7*	33.2±13.2*

	(b)		
	薬剤濃度 (M)		
	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴
NC・NA ^{*3)}	25.8±8.1*	13.0±5.9	9.4±3.3
RA・NA ^{*4)}	20.8±7.3*	30.2±8.3*	22.0±8.4*
NC・A	16.3±7.8	31.5±11.2*	26.4±7.1*
RA・A	43.3±5.9**	43.5±7.7**	19.8±7.5*

* P<0.05. ** P<0.02

*¹⁾ NC・A : LPS 刺激正常対照付着細胞

*²⁾ RA・A : LPS 刺激 RA 患者付着細胞

*³⁾ NC・NA : PHA 刺激正常対照非付着細胞

*⁴⁾ RA・NA : PHA 刺激 RA 患者非付着細胞

* mean±SE%

表 6 デキサメサゾンの (a) IL-1 産生, (b) IL-6 産生に及ぼす効果

	(a)		
	薬剤濃度 (M)		
	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴
NC・A ^{*1)}	62.8±12.6**	43.9±8.3**	42.3±10.0*
RA・A ^{*2)}	42.4±12.6*	52.8±9.5**	58.1±11.4**

	(b)		
	薬剤濃度 (M)		
	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴
NC・NA ^{*3)}	31.5±6.3*	28.3±4.8*	21.8±3.9*
RA・NA ^{*4)}	17.9±5.0*	21.3±4.7*	23.8±5.9*
NC・A	22.7±4.7*	23.9±3.2*	21.4±5.4*
RA・A	32.7±9.2*	33.1±12.5*	32.3±8.6*

* P<0.05. ** P<0.02

*¹⁾ NC・A : LPS 刺激正常対照付着細胞

*²⁾ RA・A : LPS 刺激 RA 患者付着細胞

*³⁾ NC・NA : PHA 刺激正常対照非付着細胞

*⁴⁾ RA・NA : PHA 刺激 RA 患者非付着細胞

* mean±SE%

と RA 群との間に, デキサメサゾンの IL-6 産生抑制効果において有意差を認めなかった(表6b)。

② SFMC および滑膜組織を用いる系

RA 患者より採取した SFMC および滑膜組織を上記方法により, 各種薬剤で24時間処理したあ

と、さらに24時間無刺激下で培養することにより、RA 関節液細胞からのサイトカインに対する抗リウマチ剤の作用を検討した。RA 患者 SFMC および滑膜組織は、無刺激下で大量の IL-1 および IL-6 を産生したが、添加した抗リウマチ剤は、いずれもこのサイトカイン産生に対して影響を与えなかった(データ略)。

以上より、すでに *in vivo* で活性化された IL-1 および IL-6 産生細胞に対しては、抗リウマチ剤はそのサイトカイン産生に対して抑制的に作用しないものと推測された。

考 案

近年、RA の関節組織破壊において、滑膜細胞から産生されるサイトカインが重要な役割を果たしていることが推測されている。

Goto ら⁸⁾は、RA 滑膜細胞をクローン化することにより、マクロファージ様(A型)、線維芽細胞様(B型)、および樹状細胞様のいずれのタイプの滑膜細胞も無刺激下で IL-1 を構成的に産生していることを報告している。

また、筆者らは、RA 滑膜組織からの IL-1 産生は、RA 滑膜組織の炎症所見、X線所見、および病理組織における HLA-DR 抗原発現の程度などと正の相関があることを明らかにしている⁴⁾。IL-1 が関節組織破壊に関与する機序については、以下の点などの複合的なものであることが推測されている。① 滑膜細胞の増殖誘導、② 滑膜細胞からのコラゲナーゼやプロスタグランジンの産生誘導、③ 破骨細胞の活性化、④ 軟骨のプロテオグリカン分解促進

また、IL-6 も炎症性滑膜組織から大量に産生されていることが報告されており⁵⁾、IL-1 と並ぶ炎症性サイトカインとして滑膜炎の遷延に関与している。したがって、これらのサイトカイン産生を人為的に抑制することは、RA における関節組織破壊を阻止するうえにおいてきわめて重要である。

従来より、RA の第一選択治療薬である非ステロイド系消炎鎮痛剤(NSAID)の作用機序は、cyclooxygenase 活性阻害によるプロスタグランジン合成阻害である。しかし、日常臨床においては、NSAID のみで RA における滑膜増殖を阻止することは、きわめて困難であるのが現状であ

る。また一方では、プロスタグランジンは、マクロファージ系細胞からの IL-1 産生を促進させる作用も有する。このような状況から、さまざまな抗リウマチ薬が開発され、臨床の有効性を発揮しているが、その作用機序は不明の点が多い。

CsA は、*in vitro* において T 細胞からの IL-2 産生をいちじるしく抑制するとともに、T 細胞上の IL-2 レセプターの発現も抑制する¹⁾。CsA は、マクロファージなどの抗原提示細胞に対しても抑制的に作用するが、効果発現に要する薬剤濃度は、T 細胞に対するそれよりもはるかに高いとされる⁹⁾。さらに、CsA は、IL-1 産生に対して抑制的に作用するという報告¹⁰⁾と、IL-1 産生には影響を与えないとする報告¹¹⁾とがあり、定説がない。また、Wasik ら¹²⁾は、CsA はマクロファージ上の膜結合型 IL-1 の発現を抑制することを報告している。今回の筆者らの成績でも、CsA は LPS 刺激ヒト付着細胞からの IL-1 産生を有意に抑制はしたものの、その抑制率はたかだか30%前後にすぎず、IL-2 産生におけるような顕著な抑制効果は認められなかった。CsA の IL-6 産生に与える影響について、Zanker ら¹³⁾は、用量依存的に抑制するとしているが、一方で、Kato ら¹⁴⁾は、IL-6 mRNA の発現に CsA はまったく影響を与えないとしている。今回の検討では、CsA は非付着細胞、付着細胞のいかににかかわらず、IL-6 産生を抑制したものの、その抑制の程度はきわめて軽微であった。

SA 96 は、システインの誘導体として本邦で開発された抗リウマチ剤であり、その臨床の有効性はきわめて高い。最近、後藤ら¹⁵⁾は、ELISA を用いた系において、SA 96 がシリカ刺激ヒト末梢血単球からの IL-1 産生を著明に抑制したことを報告している。

今回の筆者らの検討においても、SA 96 はデキサメサゾンにつぐ IL-1 産生抑制効果を発揮したが、SA 96 の RA における有効性はこのような機作を介するものとも考慮される。これに対して、IL-6 の産生に対しては、非付着細胞、付着細胞のいずれにおいてもたかだか25%前後の抑制効果しか示さず、IL-1 と IL-6 産生の制御機構は異なることが示唆された。

SASP は、近年、抗リウマチ剤としての意義が再認識されるに至っている。SASP は、*in vitro* に

おけるTリンパ球の活性化に対しても抑制的に作用するという報告が散見される^{3,16)}。Comerら¹⁶⁾は、SASPはヒトPBMCのPHAなどに対する増殖反応を抑制するものの、抑制に要する濃度は100 µg/mlときわめて高いこと、pokeweed mitogen (PWM) 刺激Bリンパ球からの免疫グロブリン産生は低濃度で抑制することなどより、SASPの主たる標的リンパ球はBリンパ球であることを推測している。また、ごく最近になり、Removigら¹⁷⁾は、SASPはヒトLPS刺激単球からのIL-1産生を抑制することを報告している。しかし、彼らの実験系ではIL-1の産生系に薬剤を共存させているうえに、IL-1の測定系にマウス胸腺細胞を用いるLAFアッセイも用いているため、SASPが実際にIL-1産生を抑制したのか、IL-1アッセイ系においてその抑制効果を発揮したのかは不明といわざるをえない。今回の筆者らの検討では、LPS刺激正常人付着細胞からのIL-1産生に対するSASPの効果はばらつきが大きく、その抑制効果は有意ではなかった。これに対して、RA患者のLPS刺激単球からのIL-1産生に対しては有意の抑制を示し、RA患者は正常人に対してSASPに対する感受性が高い可能性も推測された。

副腎皮質ステロイド剤(ス剤)がIL-1産生を強力に抑制することはすでに諸家により報告されている¹⁸⁻²⁰⁾。Leeら¹⁹⁾は、ス剤のIL-1産生抑制の機序として、IL-1遺伝子からの転写の抑制と、IL-1 mRNAの安定性の減弱をあげている。また、Kernら²⁰⁾は、IL-1 mRNAの半減期の延長、IL-1前駆体の翻訳阻害、細胞外へのIL-1遊離阻害などの複合機序により、IL-1産生が抑制されるとしている。IL-6産生に関する検討は少ないが、Katoら¹⁴⁾は、デキサメサゾンがIL-6 mRNA発現を抑制すると報告している。

筆者らの検討では、IL-6産生はIL-1産生に比してデキサメサゾン抵抗性である傾向がうかがわれた。

今回の検討では、抗リウマチ剤によるサイトカイン産生抑制の機序は明らかではない。また、薬剤がサイトカインの産生を抑制しているのか、あるいは産生細胞からのサイトカイン遊離を抑制しているのかについても、明らかにすることはできない。今後、分子生物学的手法を採り入れた解析

をすることにより、それぞれの薬剤のサイトカイン産生抑制の機序が明らかになることが期待される。しかし、マイトジェン刺激を薬剤添加より、少なくとも24時間先行させたときには、薬剤のサイトカイン産生抑制効果はまったくみられなかったこと、さらに、RA患者SFMC、あるいは滑膜組織からのサイトカイン産生はまったく抑制を受けなかったことなどより、これら抗リウマチ剤の標的となる細胞は、活性化される前の静止期の細胞か、あるいは活性化ごく初期の細胞であるものと推測される。

また、今回の成績では、SASP以外は、そのサイトカイン産生抑制効果はRA患者と健康人対照との間で有意差を認めなかった。この理由としては、RA患者の末梢血におけるサイトカイン産生能はもともと大きな異常を認めないこと、すでに述べたように各種抗リウマチ剤の標的となる細胞があまり活性化されていない細胞である可能性が大きいことなどがあげられよう。また一方では、各種抗リウマチ剤の作用機序がサイトカイン産生抑制ではなく、まったく別の機序を介している可能性も否定はできない。この点は、抗リウマチ剤のよりよいスクリーニング法を開発するうえでもさらに検討の必要があろう。

最後に、今回調べた抗リウマチ剤のIL-1あるいはIL-6産生に対する抑制効果は、有意であるものの比較的弱いものであった。なかでも、IL-6産生の抑制は薬剤抵抗性であった。その原因の一つとしては、薬剤によるサイトカイン産生細胞の処理がマイトジェン処理と同時期ではなく、24時間の前処理であったことがあげられよう。しかし、CsAをはじめとする他の抗リウマチ剤による同様の前処理により、IL-2産生はいちじるしく抑制を受けたことより、IL-1あるいはIL-6産生細胞自体がIL-2産生細胞に比して薬剤抵抗性であるとも考えられる。

いずれにせよ、今後、バイオアッセイよりも感度および特異性の点ですぐれたELISAが開発されることにより、これらの点についてもより明快な答えが提出されるであろう。

文 献

- 1) Kay, J.E.: Inhibitory effects of cyclosporin A on lymphocyte activation. Sandimmune (cyclosporin). Mode of action and clinical application.

- (ed. Thomson, A.W.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1989, p 1-23.
- 2) Shiokawa, Y., Ogawa, N., Abe, C., Kosaka, S., Homma, M., Akizuki, M., Kageyama, T., Mizushima, Y., Sugahara, S., Shichikawa, K.: New antirheumatic SA96 on rheumatoid arthritis. Japan. J. Inflammation 6: 409-430, 1986.
 - 3) Symmons, D.P.M., Salmon, M., Farr, M., Bacon, P.A.: Sulfasalazine treatment and lymphocyte function in patients with rheumatoid arthritis. J. Rheumatol. 15: 575-579, 1988.
 - 4) Miyasaka, N., Sato, K., Goto, M., Sasano, M., Natsuyama, M., Inoue, K., Nishioka, K.: Augmented interleukin-1 production and HLA-DR expression in the synovium of rheumatoid arthritis patients. Possible involvement in joint destruction. Arthritis & Rheum. 31: 480-486, 1988.
 - 5) Miyasaka, N., Sato, K., Hashimoto, J., Kohsaka, H., Yamamoto, K., Goto, M., Inoue, K., Yamaoka, K.: Constitutive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 from inflammatory synovium. Clin. Immunol. Immunopathol. 52: 238-247, 1989.
 - 6) Nakai, S., Mizuno, K., Kaneta, M., Hirai, Y.: A simple, sensitive bioassay for the detection of interleukin-1 using human melanoma A 375 cell line. Biochem. Biophys. Res. Commun. 154: 1189-1196, 1988.
 - 7) Mossmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Method. 65: 55-63, 1983.
 - 8) Goto, M., Sasano, M., Yamanaka, H., Miyasaka, N., Kamatani, N., Inoue, K., Nishioka, K., Miyamoto, T.: Spontaneous production of an interleukin-1-like factor by cloned rheumatoid synovial cells in long-term culture. J. Clin. Invest. 80: 786-796, 1987.
 - 9) Varey, A.M., Champion, B.R., Cooke, A.: Cyclosporine affects the function of antigen-presenting cells. Immunology. 57: 111-114, 1986.
 - 10) Andrus, L., Lafferty, K.J.: Inhibition of T cell activity by CsA. Scand. J. Immunol. 15: 449-458, 1982.
 - 11) Wagner, H.: CsA: Mechanism of action. Transplant. Proc. 15: 523, 1983.
 - 12) Wasilk, M.A., Beller, D.I.: Induction of macrophage membrane interleukin-1 expression by T-cell dependent and T-cell independent pathways is inhibited by Cyclosporin A. Clin. Immunopharmacol. 52: 331-340, 1989.
 - 13) Zamker, B., Walz, G., Barth, C., Wieder, K.J., Strom, T.B.: Bidirectional modulation of gene expression of interleukin 6 by cyclosporine and corticosteroids. Kidney Int. 37: 601-605, 1990.
 - 14) Kato, K., Yokoi, T., Takano, N., Kanegane, H., Yachie, A., Miyawaki, T., Taniguchi, N.: Detection by *in situ* hybridization and phenotypic characterization of cells expressing IL-6 mRNA in human stimulated blood. J. Immunol. 144: 1317-1322, 1990.
 - 15) 後藤 真, 笹野 稔, 岡本全泰, 西岡久寿樹, 青塚 新, 中村恵子, 横張龍一: 簡便な抗リウマチ剤のスクリーニング系の確立. 臨床薬理の進歩 89: 87-95, 1989.
 - 16) Comer, S.S., Jasin, H.G.: *In vitro* immunomodulatory effects of sulfasalazine and its metabolites. J. Rheumatol. 15: 580-586, 1988.
 - 17) Renwig, L., Anderson, B.: Salicylazosulfapyridine (Salazopyrin) effects on endotoxin-induced production of interleukin-1-like factor from human monocytes *in vitro*. Scand. J. Rheumatol. 19: 11-16, 1990.
 - 18) Yamada, T., Miyasaka, N.: The effects of liposteroid on the production of and the responsiveness to various cytokines. Int. J. Immunother. 2: 199-208, 1986.
 - 19) Lee, S.W., Tsou, A-P., Chan, H., Thomas, J., Petrie, K., Eugui, E.M., Allison, A.C.: Glucocorticoid selectively inhibit the transcription of the interleukin 1B gene mRNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 1204-1208, 1988.
 - 20) Kern, J.A., Lamb, R.J., Reed, J.C., Daniele, R.P., Nowell, P.C.: Dexamethasone inhibition of interleukin 1 beta production by human monocytes. Posttranscriptional mechanisms. J. Clin. Invest. 81: 237-244, 1988.

*

*

*