初期慢性関節リウマチ患者に対する Lobenzarit disodium(CCA)投与前後の滑膜組織の免疫組織学的検討

澤井高志*¹⁾, 大山 明*²⁾, 力丸 暘*²⁾, 村上一宏*¹⁾, 服部 彰*²⁾, 近藤恵美子*¹⁾, 京極方久*¹⁾

Immunocytochemical evaluation of the effect of a newly developed immunomodulating drug(CCA)to the synovial tissue of patients in the early stage of rheumatoid arthritis(RA)

To evaluate the effect of a newly developed immunomodulating drug, CCA in the early stage of RA, we examined histological features, with the aid of immunohistochemical markers, in the synovial tissue of the knee joint of RA patients (within one year after onset of disease) on two occasions, that is, before and after the administration of CCA at the dose of 240 mg per day for 6 to 24 weeks. In 10 cases examined, 3 of them took as favorable course and 3 took a fair course and the remaining did not change by the administration of CCA. Immunostaining of tissues from the improved patients revealed that (1) the total number of inflammatory cells were decrease after CCA treatment, (2) the accumulation of lymphocytes, mostly B cells, in the synovia, was not detected prior to CCA administration.

Although it was impossible to count the number of HLA/DR positive cells which were consisted of various kinds of cells such as macrophages, B lymphocytes, a part of synovial lining cells, T lymphocytes and interstitial cells, the quantitative change of these cells was parallel to the total cell number in synovial tissues.

Takashi Sawai*¹⁾, Akira Ohyama*²⁾,
Kazuhiro Murakami*¹⁾, Akira Rikimaru*
Akira Hattori*²⁾, Masahisa Kyogoku*²⁾
key words : Lobenzarit disodium(CCA)
rheumatoid arthritis, early stage,
synovia, immunohistochemistry

抗リウマチ剤である Lobenzarit disodium(CCA)は, superoxide O₂ hydroxyl radical(OH[•]), singlet oxygen O₂ などの生体内活性酸素が組織傷害性を有することが知られるようになり, その捕捉物質の検索中に発見された薬剤である。本薬剤投与により, 症例によっては, 腎障害, 胃腸障害などの

軽い副作用はみられるものの^{1,2)}, 長期の連用や他剤との併用が可能であり, 投与例のなかにはかなり有効という報告がなされている^{3,4)}。しかし, CCA が直接の炎症の場である RA 患者の関節の滑膜組織に対してどのような影響を及ぼすかという検討はいまだなされてない。そこで,

今回は, 初期の RA 患者10例について, 臨床症状, および検査データを検討するとともに, CCA 投与前後の滑膜組織を採取し, モノクローナル抗体を用いて免疫組織学的な面から検討した。

対象と方法

患者は, 国立鳴子病院の整形外科を受診した10名の患者であり, 表1に示したとおり, 発症後2ヵ月から1年までの非常に早期の症例である。患者は, すべて1987年にアメリカリウマチ学会によって新しく提唱された RA の診断基準を満たしていたが, 早期の症例であったため, 7項目中4項目を満たすものが6例, 5/7が3例, 6/7が1例で, RA と診断されるのに必要な最低の項目数である4項目を満たすものが多かった。stage も stage I が9例, stage II が1例, class は2が7例, 3が3例であった。なお, ここでいう罹病期間とは, 患者の記憶による関節痛や腫脹などに基づいて算出されたものである。上記10例に対して, CCA 240 mg/day を6週間から16週間経口投与した。

治療効果の判定は, 疼痛, 運動制限, 関節の腫脹などの臨床症状のほか, Lansbury index を含む種々の臨床検査データなどで判定した。

滑膜組織については, これまで筆者らが行ってきた方法で検討したが⁵⁾, 簡単に述べるとつぎのようになる。浸潤する炎症性細胞について, 定性・定量的判定を行うために, 関節鏡視下に採取した滑膜組織をドライアイス-アセトンにて凍結し, それをクリオスタット(Bright 社)にて4μに

*¹⁾ Department of Pathology, Tohoku University School of Medicine 東北大学医学部附属病院病理部

*²⁾ Department of Orthopedics, Narugo National Hospital 国立鳴子病院整形外科

表 1 Clinical data of 10 patients with RA in early stage
(Clinical features of 10 cases with rheumatoid arthritis in early stage)

No.	sex age	duration	diagnosis	stage	class	CCA interval	clinical efficacy
1.	F 40	2M	4/7	I	2	16W	moderately improved
2.	M63	6M	4/7	I	3	8W	moderately improved
3.	M67	6M	5/7	I	2	12W	moderately improved
4.	M57	3M	5/7	I	2	6W	slightly improved
5.	F 63	6M	6/7	II	2	12W	slightly improved
6.	M44	5M	4/7	I	2	8W	slightly improved
7.	M38	11M	4/7	I	2	8W	unchanged
8.	F 34	12M	4/7	I	2	8W	unchanged
9.	F 58	3M	4/7	I	3	7W	unchanged
10.	F 56	7M	5/7	I	3	12W	unchanged

They are arranged and numbered in order of clinical efficacy. Patients fulfilled 4 to 6 of the 7 RA criteria revised by ARA in 1988. Stage and class are estimated by Steinblocker's criteria at the biopsy.

表 2 Histological classification of RA synovium
Histological features of synovial lesions discriminated by lymphocytes aggregates and background components

1. degree and patterns of lymphocytes aggregates
 - 0: no aggregates of lymphocytes
 - 1: small aggregates of lymphocytes scattered in synovia
 - 2: zonal aggregates of lymphocytes under synovial lining
 - 3: well developed follicles consisted of many lymphocytes
2. interfollicular or background features
 - A: edema
 - B: diffuse inflammatory infiltration
 - C: granulation with capillary proliferation
 - D: fibrosis

薄切し、最初の1枚はヘマトキシリン-エオジン(HE)、つぎの切片からは Avidin-Biotin-Complex(ABC)法を用いた方法で免疫染色を行った。

一次抗体は、anti-Leu 4(CD3), -Leu 3a(CD4), -Leu 2a(CD8), -Leu 14(CD22), -HLA-DR 抗体で、いずれも Becton-Dickinson 社のものを用いた。

二次抗体, ABC kit は Vector 社のものを用いた。また、発色は 3-3'diaminobenzidine(DAB)を用いた。

HE 染色した標本については、光学顕微鏡下に

その像の特徴を把握し、表2に従って判定した。この評価は滑膜の組織像についてリンパ球の集簇傾向を0~3、その背景にある像をA~Dにわけて分類したものである^{6,7)}。

モノクローナル抗体による免疫染色を施行した標本は、対物マイクロメーターを用いて、500×500 μ の区画の中に浸潤するそれぞれの細胞数をカウントした。関節鏡で採取した生検試料は、小さいため多くの視野は計測出来なかったが、ほぼ試料全体を網羅するように5~10個の視野を計測した。各症例の比較はカウントした細胞数を合計し、それを計測した区画の数で割って、それぞれの種類のモノクローナル抗体における陽性細胞数を、1例につき1区画の平均の細胞数としてあらわした。

なお、HLA/DR 陽性細胞は形が樹状形、紡錘形、楕円形、円形など多種多彩で、数も多く、カウントが困難であったため、投与前後の増減のみを評価の対象とした。

血液については、血沈値、白血球数などの一般的な検査やリウマトイド因子、RAHA などの免疫学的検査の他にリンパ球 subset の分類も行った。

結 果

結果を表1に示す。臨床評価は著明改善(fairly improved), 改善(improved), やや改善(slightly improved), 不変(unchanged), やや悪化(slightly

図1 Fairly improved case(case 2), the number of T(CD3⁺)and B(CD22⁺)cells were decrease after CCA treatment

worsen), 悪化(worsen), 著明悪化(fairly worsen)の7段階にわけて行った. 10症例のなかで改善3例, やや改善3例, 不変4例であり, 悪化した症例はなかった.

罹病期間からみると, 改善傾向をみた症例で平均5.7ヵ月, 不変例の平均が8.8ヵ月と改善例がより早期から治療をはじめたほうに多い傾向がみられた.

Lansbury Index は, 改善例, やや改善例で値が小さくなるのに対し(4/6), 不変例では大きくなり(2/4), 臨床的評価とほぼ一致していた(表3).

関節鏡所見は改善傾向のみられた例では, 特に所見のないものから“けば立ち”など軽度の変化を伴うものまでみられたが, 治療の前後では大きな変化はなかった. 不変例では“けば立ち”がめだったが, これも CCA の投与前後ではそれほど変化がなかった.

また, 関節液の量, 血液, 関節液の種々の因子に改善例, やや改善例, 不変例いずれも大きな変

表3 Lansbury index at the time of pre- and posttreatment of CCA.

No.	pre.	post	response
1	20 ⇒ 8		responder
2	60 ⇒ 53		responder
3	145 ⇒ 94		responder
4	50 → 65		responder
5	164 ⇒ 69		responder
6	31 → 33		responder
7	42 ⇒ 40		non-responder
8	51 → 61		non-responder
9	94 → 104		non-responder
10	135 ⇒ 106		non-responder

pre: pretreatment. post: psottreatment. ⇒: index decreased. →: index increased

化はなく, 血液, 関節液のリンパ球のサブセットは投与の前後で一定の傾向は みられなかった(データ省略).

臨床的に改善した例と, そうでなかった例の滑膜組織所見を比較すると, 改善例では症例2で2

図2 Fairly improved case(case 4), the number of T(CD3⁺) and B(CD22⁺) cells were decreased after CCA treatment.

表4 Number of CD3 and CD22 positive cells in synovia at the time of pre- and posttreatment of CCA.

No.	CD3		CD22	
	pre.	post.	pre.	post.
1	12.0	⇒ 6.8	0	⇒ 0
2	85.0	⇒ 35.2	3.7	⇒ 0
3	193.0	⇒ 138.0	14.2	⇒ 3.1
4	210.0	⇒ 19.0	4.7	⇒ 0
5	136.0	⇒ 176.0	2.5	⇒ 7.8
6	42.0	⇒ 35.0	0	⇒ 0
7	58.0	⇒ 36.0	3.8	⇒ 3.7
8	80.0	⇒ 176.0	3.2	⇒ 13.0
9	12.5	⇒ 41.5	0	⇒ 0.2
10	179.0	⇒ 321.0	14.0	⇒ 28.0

→: well developed lymphoid follicles

Bが0Bとなり(図1), 症例4で2Bが1Cになる(図2)など全体の浸潤細胞, 特に濾胞間のリンパ球の減少傾向はみられたが, 不変例ではむしろ

増加する傾向にあった。

表4は, CD3 陽性細胞(Tリンパ球)と CD22 陽性細胞(Bリンパ球)の変化を示したものであるが, 改善傾向を示した6例中5例でいずれの細胞も減少傾向を示し, 不変例では4例中3例で増加傾向を示していた。

また, CD3 陽性細胞はほとんどが CD4(helper/inducer)陽性のものであった。また, 改善例と不変例の大きな違いは不変例では, CCA 投与前の滑膜組織では4例中3例に CD22 陽性細胞(Bリンパ球)を主体とするリンパ球の集簇傾向が認められるのが多かったのに対し(図3), 改善例ではBリンパ球の集簇がないか, あっても非常に小さなものが多かったことである(5/6)(表5)。

考 察

CCA が RA に対して有効であることは, これまで数多く報告されてきたが^{3,8)}, 一般検査結果には一定の傾向はなく, いかなる機序で CCA が効果を発揮するかということは, いまだ十分には

図 3 Unchanged case(case 8), B(CD22⁺)cell aggregates were unaffected by CCA treatment.

表 5 Histological changes at the time of pre- and post treatment of CCA.

No.	Histological classification		aggregates of CD22 positive cells	
	pre.	post.	pre.	post.
1	0A	0C	—	⇒ —
2	2B	0B	—	⇒ —
3	2B	2C	—	⇒ —
4	2B	1C	—	⇒ —
5	1B	1C	±	⇒ ±
6	0C	0D	—	⇒ —
7	1B	1C	±	⇒ ±
8	1B	→ 3B	+	→ +
9	0B	0C	—	⇒ —
10	3B	→ 3B	+	→ ++

pre: pretreatment. post: posttreatment. ⇒: unchanged or decreased. →: increased(include 0⇒0). Values are the number of CD3 and CD22 positive cells in a square(0.25 mm²).

明らかにされていない。Tリンパ球への影響を通して免疫能の平衡を回復するという説もあるが^{9,10)}、これに反対する報告もある¹¹⁾。しかし、

多くの報告をみると、B細胞の抑制はB細胞に対する直接的作用ではなく、T細胞を介してという点ではほぼ一致している。

今回は、CCAを投与したRA患者の臨床症状と滑膜組織の関係を検討した。症例のなかにはRA因子陰性の症例が3例ある一方で、初期の段階で滑膜にB細胞がまったく認められないにもかかわらず、血清のリウマトイド因子がすでに陽性となっている症例もあった。これらの結果は、RAにおけるリウマトイド因子の位置づけ、病因性の問題や、リウマトイド因子が滑膜組織でのみ産生されるのではなく、他の臓器、たとえばリンパ節や骨髄などでも産生される可能性を示唆するものである。

RA初期の滑膜を観察すると、リンパ濾胞の形成や形質細胞の浸潤はなく、炎症の最盛期とは異なる病像を呈している。たとえば、症例1のような発症2ヵ月という非常に早期の場合には、滑膜は全体的にやや浮腫性ではあるものの、炎症性細胞の数は非常に少なく、血管の周囲に紡錘形の胞体を有するやや大型のHLA/DR陽性細胞がわず

かにみられるのみである。この細胞は、dendritic cell あるいは interstitial cell ともよばれ、HLA/DR 抗原をかなり強力に発現している^{12,13)}。

そして、症例3のように、時間的経過とともに HLA/DR 陽性細胞の周囲に T リンパ球の浸潤がみられてくる。この現象は、RA の場合まずなんらかの刺激によって HLA/DR 陽性細胞が賦活化され、これに対し T リンパ球が反応し、活性化されていくという HLA/DR 陽性細胞→T リンパ球の関係を時間的経過で示しているように思われる。しかし、この段階では、いまだ B 細胞の集簇はみられない。症例により若干の違いはあるが、B 細胞が浸潤、増殖するのは、発病後 5～6 ヶ月で、この時期になると、それまでは 1 であった CD4⁺ (helper/inducer) 細胞と CD8⁺ (suppressor/cytotoxic) 数の比率が、CD4⁺ 細胞の増加によりしだいに増加してくる。

以上より、早期の滑膜の病像を経時的にまとめみると、HLA/DR 陽性細胞→T リンパ球 (CD4⁺=CD8⁺ から CD4⁺>CD8⁺)→B 細胞となる。

さて、CCA を投与した10症例のなかで改善例、やや改善例など有効症例は6例であった。この特徴は、投与開始までの罹病期間が改善例では平均 5.7 ヶ月であるのに対し、不変例では 8.8 ヶ月で、他の疾患と同様、RA においても早期診断、早期治療が有効であることを示している¹⁴⁾。

組織学的には、CCA の投与によってつぎの二つのことが明らかになった。

第一は、投与による改善例では、投与前後で滑膜組織全体の炎症性細胞の数が一様に減少していたのに対し、不変例では増加していた。

第二は、不変例では投与前の滑膜組織にすでに B 細胞の集簇が認められたのに対し、改善例では投与前にこのような B 細胞の集簇の像はなかったことである。

したがって、組織学的にみるならば、先に述べた HLA/DR 陽性細胞→T リンパ球→B リンパ球という時間的経過のなかで、CCA は HLA/DR 陽性細胞→T 細胞、T 細胞→T 細胞、T 細胞→B 細胞のいずれかの間では有効であるものと考えられる。この点はステロイド投与例において、投与前にみられた B 細胞の集簇が投与後には消失あるいは減少していたこととは対照的である。

これまで、CCA に関する報告は量的なもので

りむしろ質的・機能的な面を中心とした *in vitro* での検討が多かった^{15,16)}。そのなかには、① Ia 抗原、IL-1 産生の抑制、② suppressor/cytotoxic T 細胞の誘導¹⁷⁾、③ NK 細胞の活性化などがあげられている^{18,19)}。一方、④ B 細胞にはほとんど影響を与えないという報告もみられる²⁰⁾。

これを今回の結果と比較してみると、① HLA/DR の発現の抑制、④ の B 細胞に影響を与えないという結果は一致する。一方、③ NK 細胞については、初期 RA の滑膜には NK 細胞がほとんどなく、投与後もこの状態はあまり変わらないことから、*in vivo* では NK 細胞の関与は少ないと考えられる。問題は、②の suppressor T 細胞と cytotoxic T 細胞の機能亢進をどのように解釈するかである。一つには *in vitro* の場合は個体全体の細胞数、つまり量的な問題を無視しているため、一つ一つの成分は亢進していても、それが生体内の状態を反映しているとはいいがたい。特に、免疫系に関与する細胞群においては、かなり複雑な細胞の相互関係を形成しているため、*in vitro* と *in vivo* の結果が逆になる場合も十分考えられ、今後この点からの考察も必要となろう。もう一つは、Leu 3a 陽性細胞のほうが Leu 2a 陽性細胞に比較し、相対的に数が多いため増減も大きく、したがって、helper/inducer 機能の低下がめだって、相対的に suppressor/cytotoxic 細胞の機能が亢進したようになるとも考えられる。さらに、CCA は免疫調節剤といわれるごとく HLA/DR 陽性細胞→T 細胞→B 細胞の系については抑制、cytotoxic T 細胞については亢進というように、一方には抑制、他方には亢進といった相反する作用を及ぼすことも考えられる。これらの点は、今後に残された問題であるが、それに関連して、CCA が個々の細胞に対して同じような作用を及ぼすのか、それとも、HLA/DR 陽性細胞のような免疫現象のはじまりに位置する細胞に作用して、全体の免疫系の動きを抑制あるいは調節するのかということである。

今回の結果は、これまで *in vitro* でいわれてきたように、CCA は HLA/DR の発現や B 細胞活性化に関与する T 細胞の働きを抑制する可能性を示唆するものである。CCA はステロイドに比較し、作用機序が異なるばかりでなく、炎症を抑える力は弱い。しかし、一方では副作用がきわめて

弱く、RA の初期に対してかなり効果的であることから、適用のいかんによってはかなり有効な治療薬となりうるものと思われる。今後は、さらに臨床例を重ねて治療効果を検討していく必要がある。

文 献

- 1) 伊藤元弥：CCA の慢性関節リウマチに対する長期投与試験。医学と薬学 8：1991-2000, 1982.
- 2) 松浦美喜夫：慢性関節リウマチに対する CCA (Lobenzarit disodium) の長期投与試験。医学と薬学 8：1529-1541, 1982.
- 3) 塩川優一，堀内淑彦，大藤 真・他：新しい抗リウマチ剤 Lobenzarit Disodium (CCA) の慢性関節リウマチに対する臨床的検討(第3報)—多施設二重盲検法による比較検討—。医学の歩み 124：668-683, 1983.
- 4) 小坂志郎，花梅 清，熊谷勝男：新しい免疫調節剤 CCA の慢性関節リウマチに対する臨床効果，血中濃度および Immune Complex におよぼす影響。臨床と研究 58：977-982, 1981.
- 5) 沢井高志，京極方久：慢性関節リウマチの免疫学的研究。Proceeding of the First Monoclonal Antibody Congress. (ed. Schlossman, S.F., Osamura, S.), Realize Inc., 東京, 1985, p 140-147.
- 6) 大山 明，服部 彰，力丸 陽，澤井高志，秋山文世，斉藤隆幸：慢性関節リウマチにおける膝関節鏡下滑膜生検例の検討。関節鏡 13：39-42, 1988.
- 7) 沢井高志，大山 明，村上一宏，力丸 陽，服部彰，京極方久：慢性関節リウマチ滑膜初期病変の免疫組織学的検討—モノクロナル抗体を用いた定性ならびに定量的解析—。リウマチ, (in press).
- 8) 大藤 真，江澤英光，細木英美：慢性関節リウマチに対する Lobenzarit disodium(CCA)の臨床検討—多施設共同試験—。臨床と研究 60：239-246, 1983.
- 9) 矢田純一，田中順子，前田千春，金田一孝：慢性関節におけるリンパ球の異常とそれに対する CCA の投与効果。臨床免疫 14：554-560, 1982.
- 10) 園崎秀吉，三井 弘：慢性関節リウマチにおける

T細胞の異常およびこれに対する免疫調節剤 CCA の影響。リウマチ 24：3-8, 1984.

- 11) 上尾豊二，奥村秀雄，山室隆夫：CCA 投与における慢性関節リウマチの血中，関節液中のリンパ球サブセット。炎症 5：311-316, 1985.
- 12) 稲葉カヨ：免疫応答における樹状細胞の役割。実験医学 4：436-439, 1986.
- 13) Zvaifler, N.J., Steinman, R.M., Kaplan, G. et al.: Identification of immunostimulatory dendritic cells in the synovial effusions of patients with rheumatoid arthritis. J. Clin. Invest. 76: 789-800, 1985.
- 24) 延永 正：RA の早期診断，早期治療。リウマチ 27：163-165, 1987.
- 15) 伊東恭悟，新谷茂樹，高橋 哲，熊谷勝男，小坂志郎，Lobenzarit disodium, CCA のマクロファージ機能 Ia 抗原発現とインターロイキン1産生に対する働き。1.慢性関節リウマチ患者ならびに健康人末梢単球に対する作用。臨床免疫 19:343-353, 1987.
- 16) 伊東恭悟，新谷茂樹，松井英夫：マクロファージ Ia 抗原性を調節する因子。Therapeutic Research 1: 37-41, 1984.
- 17) 小川博遊，恒松徳五郎：サブプレッサーT細胞の免疫調節的作用。アレルギー 31: 207-213, 1982.
- 18) Itoh, K., Saitoh, F., Kumagai, K., Kosaka, S.: Depressed natural killer activity in rheumatoid arthritis and its *in vitro* augmentation with interferon and N-(2-carboxyphenyl)-4-chloranthranilic acid disodium(CCA), and antiarthritis agent. The Ryumachi 21: 69-74, 1981.
- 19) 大原守弘，五十嵐 哲，小橋主税，白土雅美，熊川宏美，佐久間博史，渡辺一雄，七宮 実，吉田直樹，吉田 浩，糟川礼司：リンパ球のNK, ADCC 活性およびインターフェロン産生におよぼす抗リウマチ剤 N-(2-carboxyphenyl)-4-chloranthranilic acid disodium (CCA) と D-penicillamine の作用。炎症 3：222-225, 1983.
- 20) 荒井澄夫，宗像哲男，山本英彦：disodium 4-chloro-2, -2'-iminodiabenzooate(CCA)のヒト immunoglobulin 産生細胞に対する作用。炎症 4：118-121, 1984.