MRL/Mp-*lpr/lpr*(MRL/*l*)マウス関節病変 における軟骨, 骨組織の変化(第1報)

—ossification groove of Ranvierの関節破壊の場としての意義—

田中真希^{*1,2)}, 澤井高志^{*2)}, 永渕龍彦^{*1)}, 望月静枝^{*2)}, 藤井克之^{*1)}

*Cartilage degeneration of arthritic knee joints of MRL/Mp-*lpr/lpr* mice*

Objectives : In order to detect the early stage of cartilage destruction of rheumatoid arthritis, we histopathologically examined the knee joints of MRL/Mp-*lpr/lpr* (MRL/*l*) mice.

Materials and methods : The serum levels of anti-type II collagen antibodies and rheumatoid factors in female MRL/*l* mice (3-36 weeks old) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Knee joints were obtained from female MRL/*l* mice (3-22 weeks old) and examined by hematoxylin-eosin staining, tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) staining and immunohistochemical method. Anti-cathepsin-L antibody was used in this study to detect the relation between inflammatory cells and matrix degradation.

Results : The anti-type II collagen antibodies in sera were found from 4 weeks old preceding the increase of rheumatoid factors. Inflammatory cells were appeared from 4 weeks old. They were remarkably accumulated in the ossification groove of Ranvier (R-zone) in the posterior part of the femur. The osteoclasts were confirmed by TRAP staining and their number was increased in the course of the age as well as the serum level of anti-type II collagen antibodies. Some inflammatory cells in R-zone strongly expressed cathepsin-L, which indicated that these cells participated in the cartilage destruction.

Conclusion : These results suggest that the direct cartilage destruction occurs with few or no evidences of synovitis.

Rec. 10/31/1996, Acc. 12/9/1996, pp 129~134

*Maki Tanaka^{*1,2)}, Takashi Sawai^{*2)}, Tatsuhiko Nagafuchi^{*1)},
Shizue Mochizuki^{*2)}, Katsuyuki Fujii^{*1)}*

key words : MRL/*l* mouse, rheumatoid arthritis (RA), cartilage,
anti-type II collagen antibody, ossification groove of Ranvier

慢性関節リウマチ(RA)における関節破壊は、増殖した炎症性滑膜、いわゆるパンヌスの浸潤により生じるとする見方が一般的である。しかし近年、軟骨細胞自身がマトリックスメタロプロテ

アーゼ(MMP)^{1,2)}、システインプロテアーゼ³⁾など種々の蛋白分解酵素を産生して自らの基質の分解に関与していること、これらの酵素の産生・分泌は interleukin-1 (IL-1) や interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor α (TNF α) などのサイトカインのオートクリン⁴⁾、パラクリン⁵⁾的な調節を受けることが報告され、関節破壊における軟骨細胞自体の動態が注目されるようになった。Dingleらは免疫組織化学的に、RA患者におけるII型コラーゲンの変性が軟骨の表層のみならず深層にも

^{*1)} Department of Orthopaedics, Tokyo Jikei University School of Medicine 東京慈恵会医科大学整形外科

^{*2)} Department of Pathology, Tohoku University Hospital 東北大学医学部附属病院病理部
Offprint requests to : Maki Tanaka, Department of Pathology, Tohoku University Hospital, 1-1 Seiryō-cho, Aoba-ku, Sendai 980-77, Japan

生じていることを証明し⁶⁾、パンスとは離れた部位での軟骨破壊を報告している。

しかし、ヒトのRAでは発症早期に軟骨を採取することはほとんどなく、手術などで関節組織を採取する段階ですでに病変が高度かつ広範に進行しているため、軟骨の初期変化を観察することは困難である。そこで筆者らは、RAの動物モデルとして関節炎を自然発症するMRL/Mp-*lpr/lpr* (MRL/*l*)マウスを用い、発症初期の関節炎について、軟骨を中心とした病理組織学的変化、および基質であるII型コラーゲンに対する免疫応答を検討した。

材料と方法

(1) 実験動物

軟骨の初期病変を検索するために滑膜炎の軽微な雌のMRL/*l*マウス(日本チャールズ・リバー社にて同社による飼料CRF-1を用いて維持されたSPF動物)を選択し、週齢ごとに輸送されたものをただちに実験に用いた。マウスは3週から36週齢の70匹で、筆者らが従来施行している方法に従ってエーテルで麻酔し採血を行った。脱血の後、3週から22週齢のMRL/*l*マウス49匹については膝関節組織を採取した。コントロールとして、8-40週齢、雌のB/WF1マウス50匹の血清、および15週齢、雌のDBA/1Jマウスの膝関節を同様にして採取した。

(2) 血清抗体価の測定

血清中の抗II型コラーゲン抗体価、およびリウマチ因子の測定を行った。いずれもIgGクラスの抗体をenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法にて測定したが、抗II型コラーゲン抗体価の測定にはFujiiらが報告した⁷⁾方法を用いた。すなわち、リン酸緩衝液(pH 7.6)で5 µg/mlに溶解したヒトII型コラーゲン(native type)溶液をELISAプレート(Serocluster U plate, Costar Co., Cambridge, USA)の各ウェルに100 µlずつ注入してコーティングし、洗浄した後、非特異的蛋白吸着阻止のため100%正常ウサギ血清(normal rabbit serum; NRS)を100 µlずつ注入した。洗浄後にNRSで50倍希釈したマウス血清

⇒ { MRL/*l* n = 5 6 6 5 5 10 9 8 6 5 5
B/WF1 n = 11 11 11 10 7

図1 MRL/Mp-*lpr/lpr*マウスの週齢に伴う血清抗体(抗II型コラーゲン抗体、リウマチ因子)価の推移

抗体はIgGクラスのもので、いずれもELISA法を用いて492 nmでの吸光度を測定し、抗体でコーティングしていないプレートでの吸光度をブランクとして減じ、グラフにプロットした。MRL/*l*マウス(n=70)において、抗II型コラーゲン抗体価(■)は、リウマチ因子(●)に先立って上昇する。一方、B/WF1マウス(n=50)においては、いずれの週齢においても抗II型コラーゲン抗体価(◆)の上昇を認めない。

を100 µlずつ反応させ、洗浄し、NRSを25%含む0.1 M トリス緩衝生理食塩水(pH 7.2)で2000倍に希釈したペルオキシダーゼで標識したウサギ抗マウスIgG(ZYMED Laboratories Inc., San Francisco, USA)100 µlを反応させた。発色にO-phenylenediamineを用いて492 nmでの吸光度を測定し、コラーゲンコーティングしていないプレートでの吸光度をブランクとして減じた。

なお、Teratoらの方法⁸⁾により、II型コラーゲンで免疫されたサルの血清の吸光度をもとに作成した標準曲線を用いた。

(3) 組織の固定・脱灰

採取した膝関節組織は、ただちに矢状面で半割し、従来より筆者らが行っている方法にて固定、脱灰処理を行った⁹⁾。簡単に述べると、periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP)溶液にて4°Cで6時間固定し、冷アルコールで脱脂して、15%グリセロール加EDTA溶液にて-5°Cで約1週間脱灰し、十分な脱灰状態を確認して脱水の後、パ

図2 R帯の病理組織像(HE染色 ×50)
(a) 4週齢で、すでに炎症性細胞が出現している。(b) 8週齢では、血管増生、大型細胞の出現を伴う著明な炎症所見を認める。

ラフィンに包埋し、ブロックより $2\mu\text{m}$ の薄切切片を作成した。

(4) ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色による観察

切片に HE 染色を施行し、滑膜、および骨・軟骨の病理組織像を観察し、加齢に伴う変化について検討した。

(5) 酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ(TRAP)染色とその評価

MRL/l マウスでは、コントロールである DBA/1J マウスにくらべ大型で多核の細胞が目立ったため、組織切片に TRAP 染色を施行し、破骨細胞であることを確認した¹⁰⁾。染色には酸ホス染色キット(武藤化学)を用い、L-酒石酸を加え

て、 37°C で3時間反応させた。細胞の活性化を示唆する胞体の大きな(面積 $0.5\mu\text{m}^2$ 以上)TRAP陽性細胞を選択して 0.2mm^2 当たりの数をカウントし、1)部位別にみた細胞数の差異、2)炎症部における細胞数の加齢に伴う変化について検討した。

(6) 免疫組織化学的方法

システインプロテアーゼの一つである cathepsin-L (Cat-L) の存在を同定するために、抗 Cat-L 抗体(家兎)(順大、木南教授より分与)¹¹⁾を用いて、筆者らの方法⁹⁾に従って、酵素抗体法による免疫組織化学染色を施行した。すなわち、切片に対し、 $0.3\%\text{H}_2\text{O}_2$ 添加による内因性ペルオキシダーゼ阻止、 10% の正常ヤギ血清での非特異的蛋白吸着阻止操作の後、一次抗体として抗 Cat-L 抗体を 4°C で一晩反応させた。二次抗体にはヤギ抗ウサギ IgG 抗体(Vector Laboratories, USA)を用い、最後に 3-3'-diaminobenzidine で発色させた。

結 果

(1) 血清抗体価

抗II型コラーゲン抗体価は生後4週より上昇をはじめ、16週から24週齢でプラトーに達した。一方、リウマチ因子はそれより遅く8週齢で出現し、23週齢で最高値を示した。また、コントロールである B/Wf1 マウスの抗II型コラーゲン抗体価は、8-40週のいずれの週齢でも上昇を認めなかった(図1)。

(2) HE 染色

今回筆者らが用いた MRL/l マウスでは、炎症性細胞の浸潤を伴う滑膜炎はきわめて軽度であった。18週齢からわずかに滑膜増生がみられたものの、滑膜炎による骨の侵食像は観察されなかった。しかし、すでに4週齢で、成長軟骨帯と骨膜にはさまれた ossification groove of Ranvier(以後R帯と省略)の特に大腿骨屈側に炎症性細胞が集積し、他の部位にくらべて大型の細胞の数も増加していた(図2a)。

この大型細胞には多核のものと単核のものがあり、破骨細胞、および単球-マクロファージ系細胞の像を呈していた。加齢に伴い、炎症性細胞は骨

図3 TRAP陽性細胞数の部位別の比較

3-10週齢 MRL/l マウス (n=37) について、面積 $0.5 \mu\text{m}^2$ 以上の TRAP 陽性細胞を選び、 0.2mm^2 当たりの数をカウントした。R 帯の大腿骨屈側 (Post. F.)、次いで伸側 (Ant. F.) における細胞数が多く、成長軟骨・骨幹部移行部は大腿骨 (GP. F.)、脛骨 (GP. T.) ともに少数であった。

図4 TRAP陽性細胞数の加齢に伴う推移
3-22週齢 MRL/l マウス (n=49) の大腿骨屈側 R 帯において、面積 $0.5 \mu\text{m}^2$ 以上の TRAP 陽性細胞を選び、 0.2mm^2 当たりの数をカウントした。3-6週齢で最大値を示し、以後は減少傾向を示す。

端部側では軟骨、骨幹部側では骨、そして中心部に向かっては骨髄を侵食するように広がり、8-9週齢では血管増生も著明であった(図2b)。その後次第に血管や炎症性細胞浸潤は消滅し、線維成分が目立つようになった。

コントロールとして用いた DBA/1J マウスでは、成長軟骨・骨膜移行部に R 帯は確認されたものの、MRL/l マウスに比較して大型細胞を含む炎症性細胞は少数で、幼若な間葉系細胞をわずかに認めるのみであった。

(3) TRAP 染色

TRAP 陽性細胞は、R 帯、および成長軟骨・骨幹部移行部に主に認められた。このうち面積が $0.5 \mu\text{m}^2$ 以上の細胞は、R 帯の大腿骨屈側、次いで伸側の順に多数認められ、それに比較して大腿骨、および脛骨の成長軟骨・骨幹部移行部では少数であった(図3)。集積の顕著な大腿骨屈側 R 帯における陽性細胞数の加齢的变化をみると、3-6週齢で最大値を示し、以後減少して 15 週以後は横ばいとなった(図4)。

DBA/1J マウスでは、活性化されていることを

示す、胞体の大きな TRAP 陽性細胞はほとんど認められなかった。

(4) 免疫組織化学染色

関節軟骨表層、および R 帯に Cat-L 陽性細胞を認めた(図5)。これらの大部分は、紡錐形の間葉系ないしは単球-マクロファージ系の細胞であったが、TRAP 陽性細胞の一部にも存在が認められた。

考 察

Fujii らは、血清抗 II 型コラーゲン抗体について、軟部組織ではなく硝子軟骨由来の II 型コラーゲンに特異的な IgG クラスのものであり、リウマチ因子の出現に先行して初期 RA 患者で高値を示すことを報告している¹²⁾。ELISA 法では IgM クラスのリウマチ因子は RA 非特異的に検出される傾向があり¹³⁾、MRL/l マウスにおいては IgG クラスと一致する変動を示したため(データ未発表)、今回は抗 II 型コラーゲン抗体、リウマチ因子ともに IgG クラスの抗体のみを測定したが、ヒト

図 5 Cathepsin-L の免疫組織化学染色(酵素抗体法 ×100)

R 帯において、間葉系、ないしは単球-マクロファージ系の形態を有する細胞に陽性所見が認められる。

RA 患者と同様に抗 II 型コラーゲン抗体価はリウマチ因子に先立って 3-4 週齢で上昇をはじめた。

そして滑膜炎を認める以前に、抗体価の推移と平行して大腿骨 R 帯を中心に炎症性細胞が広がる事実が確認された。このことは、抗 II 型コラーゲン抗体と R 帯の炎症とを直接関係づける証明とはならないが、軟骨病変は滑膜炎に伴う二次的なものとする従来の見方とは異なる所見であり、II 型コラーゲンが主要成分となっている軟骨において初期の免疫応答が生じる可能性を示唆している。

この R 帯には 3 種の未分化間葉系細胞、すなわち、骨性部分をなす osteoblast-type cell、骨幅の増大に参与する chondrocyte-type cell、周辺をとり囲む fibroblast-type cell などの活発な分裂能を有する細胞とともに栄養血管 perichondral artery も存在しており、刺激により炎症の発症部位となることは十分考えられる。さらに、R 帯から骨幹端部骨膜へと連続する、II 型を主とするコラーゲンネットワークは perichondral ring of La Croix とよばれ、perichondral artery が貫通する¹⁴⁾。そして、R 帯近傍の synovial-cartilage junction に接した骨膜には、ケラタン硫酸、II 型コラーゲンといった基質の中にマクロファージなどの MHC class II 陽性細胞が存在し¹⁵⁾、その外側の関節包の attachment zone fibrocartilage には

II 型コラーゲン含有量が多いといわれる¹⁶⁾。一方、Jasin は、RA 患者の関節軟骨表面に immune deposit を認めており、その中には抗 II 型コラーゲン抗体も含まれると報告している¹⁷⁾。このような関節軟骨の II 型コラーゲンと抗体との反応が、コラーゲンの豊富な R 帯でも生じているか否かについては今後の検討を要するが、R 帯を中心とした炎症が早期から起こっていることは事実である。

さらに、システインプロテアーゼの一つである Cat-L を保有する間葉系、ないし単球-マクロファージ系細胞が R 帯と関節軟骨表層に認められたことは、この部位での軟骨破壊の存在を示している。Cat-L は、cathepsin-B (Cat-B) に比較し強力なマトリックス分解能を有するといわれており¹⁸⁾、Trabandt らにより RA 滑膜とその侵入した骨・軟骨に発現が認められている¹⁹⁾が、筆者らの結果では、明らかに滑膜とは離れた R 帯での存在が確認された。

従来、RA の初期病変は滑膜・軟骨移行部のポケット、もしくは bare area といわれる部分で発症するといわれてきた²⁰⁾。この領域には未分化な間葉系細胞が存在し、血管が入り込んでおり、軟骨と血管の接触しうる場となっている。今回、筆者らが初期病変を認めた R 帯を中心とする部位は、bare area よりやや骨幹部に近く、かつ骨膜を境界として骨の内側になるが、細胞が豊富で血管が進入するという点では、両者の環境はきわめて類似している。なお、R 帯の中でも大腿骨屈側がもっとも炎症が著しいという結果が得られたが、この理由は不明である。

また、この R 帯を含む骨・軟骨組織に対する TRAP 染色により多数の活性化破骨細胞が確認され、関節破壊への関与を示唆している。

以上の結果より、MRL/l マウスにおいては滑膜とはまったく別の R 帯を中心とする炎症が早期から発症し、軟骨・骨を侵食し、関節破壊の一端を担っていることが証明された。これと同様な現象がヒトでも生じているか否かの実証は困難であるが、今後はヒト RA の発症についても軟骨の変性という観点が重要と考える。

稿を終えるにあたり、カテプシン-Lの抗体を分与下さいました順天堂大学生化学教室 木南教授に深謝いたします。また、免疫組織染色を協力していただきました病理検査技師の金子知香さんに御礼申しあげます。

文 献

- 1) Dodge GR, Poole AR : Immunohistochemical detection and immunochemical analysis of type II collagen degradation in human normal, rheumatoid and osteoarthritic articular cartilage cultured with interleukin 1. *J. Clin. Invest.* 83 : 647-661, 1989.
- 2) Smith RJ, Rohloff NA, Sam LM, Justen JM, Deibel MR, Cornette JC : Recombinant human interleukin-1 alpha and recombinant human interleukin-1 beta stimulate cartilage matrix degradation and inhibit glycosaminoglycan synthesis. *Inflammation* 13 : 367-382, 1989.
- 3) Van Noorden CJ, Smith RE, Rasnick D : Cysteine proteinase activity in arthritic rat knee joints and the effect of a selective systemic inhibitor, Z-Phe-Ala CH2F. *J. Rheumatol.* 15 : 1525-1535, 1988.
- 4) Shinmei M, Masuda K, Kikuchi T, Shimomura Y, Okada Y : Production of cytokines by chondrocytes and its role in proteoglycan degradation. *J. Rheumatol.* 18(suppl. 27) : 89-91, 1991.
- 5) Shinmei M, Okada Y, Masuda K, Kikuchi T, Shimomura Y : The mechanism of cartilage degradation in osteoarthritic joints. *Semin. Arthritis Rheum.* 19(suppl. 1) : 16-20, 1989.
- 6) Dingle JT, Horner A, Shield M : The sensitivity of synthesis of human cartilage matrix to inhibition by IL-1 suggests a mechanism for the development of osteoarthritis. *Cell Biochem. Funct.* 9 : 99, 1991.
- 7) Fujii K, Tsuji M, Murota K, Terato K, Shimozuru Y, Nagai Y : An improved enzyme-linked immunosorbent assay of anti-collagen antibodies in human serum. *J. Immunol. Methods* 124 : 63-70, 1989.
- 8) Terato K, Shimozuru Y, Katayama K, Takemitsu Y, Yamashita I, Miyatsu M, Fujii K, Sagara M, Kobayashi S, Goto M, Nishioka K, Miyasaka N, Nagai Y : Specificity of antibodies to type II collagen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 33 : 1493-1550, 1990.
- 9) 澤井高志, 宇月美和, 高橋裕一, 宮崎修吉, 斎藤隆幸, 井上紘子 : パラフィン切片を用いたサイトカインの免疫組織化学的方法. *病理と臨床* 10 : 1067-1070, 1992.
- 10) Suda T, Takahashi N, Martin TJ : Modulation of osteoclast differentiation. *Endocrine Rev.* 13 : 66-80, 1992.
- 11) Sano K, Waguri S, Sato N, Kominami E, Uchiyama Y : Coexistence of renin and cathepsin B in secretory granules of granular cells in male mouse submandibular gland. *J. Histochem. Cytochem.* 41 : 433-438, 1993.
- 12) Fujii K, Tsuji M, Kitamura A, Murota K : The diagnostic significance of anti-type II collagen antibody assay in rheumatoid arthritis. *Int. Orthop.* 16 : 272-276, 1992.
- 13) Jónsson T, Thorsteinsson J, Kolbeinnsson A, Jónasdóttir E, Sigfússon N, Valdimarsson H : Population study of the importance of rheumatoid factor isotypes in adults. *Ann. Rheum. Dis.* 51 : 863-868, 1992.
- 14) Iannotti JP, Goldstein S, Kuhn JL, Lipiello L, Kaplan FS : Growth plate and bone development. (In Simon SR ed.) *Orthopaedic basic science*, American Academy of Orthopaedic Surgeons, USA, 1994, pp 188-215.
- 15) Allard SA, Bayliss MT, Maini R : The synovium-cartilage junction of the normal human knee—implications for joint destruction and repair. *Arthritis Rheum.* 33 : 1170-1179, 1990.
- 16) Ralphs JR, Benjamin M : The joint capsule—structure, composition, aging and disease. *J. Anatomy* 184 : 503-509, 1994.
- 17) Jasin HE : Autoantibody specificities of immune complexes sequestered in articular cartilage of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 28 : 241-248, 1985.
- 18) Nguyen Q, Mort JS, Roughley PJ : Cartilage proteoglycan aggregate is degraded more extensively cathepsin L than by cathepsin B. *Biochem. J.* 266 : 569-573, 1990.
- 19) Trabandt A, Aicher WK, Gay RE, Sukhatme VP, Nilson-Hamilton M, Hamilton RT, McGhee JR, Fassbender HG, Gay S : Expression of the collagenolytic and Ras-induced cysteine proteinase cathepsin L and proliferation-associated oncogenes in synovial cells of MRL/l mice and patients with rheumatoid arthritis. *Matrix* 10 : 349-361, 1990.
- 20) 京極方久, 澤井高志, 村上一宏, 伊藤潤平 : 慢性関節リウマチの病理組織学的特徴—病因・病理発生への手がかり. *日本臨床* 50 : 483-489, 1992.