慢性関節リウマチ患者滑液好中球から得る滑膜細胞傷害因子

大原守弘・粕川禮司^{*1)}、松本 淳^{*2)}

Analysis of cytotoxic factors released from synovial fluid polymorphonuclear leukocytes tested on synovial cultured cells Cytotoxic activity of polymorphonuclear leukocytes (PMN) obtained from synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis (RA) was tested on synovial cultured cells obtained from synovial tissues of RA patients in counting the remaining numbers of cells attached to the bottom of culture dish. The cytotoxic activity of PMN was not inhibited by superoxide dismutase, weakly inhibited by catalase, but strongly inhibited by a combination of trypsin inhibitor and catalase. The result would suggest that proteolytic enzyme released from are major factors which injure the synovial cells.

Morihiro Ohara・Reiji Kasukawa^{*1)}, Jun Matsumoto^{*2)}

^{*1)} Second Department of Internal Medicine, Fukushima Medical College

^{*2)} Department of Orthopaedic Surgery, Fukushima Medical College

key words: *rheumatoid arthritis, synovial fluid PMN, synovial cell, cytotoxic activity against synovial cell, proteolytic enzyme*

慢性関節リウマチ (RA) の病態を知るうえで、関節病変の中心である滑膜組織の破壊と増殖の機序を解明することは重要なことと考えられる。筆者らは、RA 患者の好中球、特に関節液の好中球に強い滑膜細胞傷害が認められることを報告した^{1,2)}。

この好中球による滑膜細胞傷害性が、好中球からだされるどのような因子により傷害されるかを知るため、抑制剤を用いて傷害性の減少変化を検討したので報告する。

材料と方法

(1) 培養滑膜細胞

RA 患者の、主として膝関節に行われた手術に際し、得られた滑膜組織片を細切し、コラゲナーゼとヒアルロニダーゼで処理後、メッシュを通し、単細胞に分離し、これを培養し、2～3代継代して安定した滑膜培養細胞を得た。この培養滑膜細胞は顕微鏡による形態上、線維芽細胞様のB型細胞である(以下滑膜細胞とよぶ)。

(2) 好中球

RA 患者の、主として膝関節より得られた滑液から、比重遠沈法と、プラスチックシャーレによる付着細胞の分離により、リンパ球と好中球を採血した。

(3) 滑膜細胞傷害試験

滑膜細胞を 1×10^4 /ml に調整し、1 ml ずつマイクロプレート (Falcon, 24穴) に入れ、定着、増殖させた後、滑液の好中球を 1×10^6 /ml にして 1 ml 加える。好中球のみ加えるものと、好中球に以下のような抑制剤を用い

て検討した。superoxide の抑制剤である superoxide dismutase (SOD) を 1～1,000 U/ml、過酸化水素 (H_2O_2) の抑制剤である catalase を 1～1,000 U/ml、トリプシンおよび他の蛋白分解酵素の抑制剤である trypsin inhibitor (TI) を 1～1,000 U/ml、SOD 100 U/ml + TI 100 U/ml、catalase 100 U/ml + TI 100 U/ml をそれぞれ加えたサンプルをつくり、経時的に顕微鏡下で形態変化を観察し、48時間後に低倍率顕微鏡下で、付着残存滑膜細胞を算定した。各テストはトリプリケートで行った。

成績

好中球を添加せず培養液のみによるコントロールで、滑膜細胞数は平均 52 ± 10 であり、これを 100% とした。滑膜好中球に SOD を加えたときの成績を図1に示した。好中球の添加により残存滑膜細胞数は 28.2% と減少し、強い傷害性が認められた。これに SOD の 1, 10, 100, 1,000 U/ml 濃度を加え、48時間後の滑膜細胞数を測定したが、細胞数はほとんど変わらず、好中球の傷害性はほとんど影響されなかった。

さらに、好中球に catalase 1, 10, 100, 1,000 U/ml 濃度を加えた場合の成績を図2に示した。catalase 100 U/ml にて平均 41.7% の残存数であり、好中球のみの平均 28.2% に比して、やや残存滑膜細胞数が増加し、好中球の滑膜細胞傷害性が抑制されたが、有意なものではなかった。

一方、好中球に TI の 1, 10, 100, 1,000 U/ml 濃度を加えた成績では、図3のごとく、残存滑膜細胞数は TI 1 U/ml で 42.2%、10 U/ml で 66.4%、100 U/ml で 78.1% と残存滑膜細胞数が増加し、好中球の滑膜細胞傷害性が抑制された。

*1) 福島県立医科大学第二内科教室

*2) 同 整形外科教室

図1 RA患者滑液好中球の滑膜細胞傷害に及ぼすSODの影響

図2 RA患者滑液好中球の滑膜細胞傷害に及ぼすcatalaseの影響

そこで、好中球に SOD 100 U/ml と TI 100 U/ml の混合液および catalase 100 U/ml と TI 100 U/ml の混合液を加えて滑膜細胞の傷害性を検討すると、図4に示したごとく、好中球のみの残存滑膜細胞数平均30.0%に対し、SOD+TI では平均72.4%と好中球の傷害性は抑制された。この値は、TI 100 U/ml 単独による抑制とほぼ同等の抑制作用であり、SOD による抑制作用の亢進は認められなかった。一方、好中球に catalase と TI の混合液を加えると、残存する滑膜細胞は平均98.0%と増加し、好中球の滑膜細胞傷害性はほぼ完全に抑制されることが認められた。

考 察

RA 患者の主病変である関節局所における滑膜組織の破壊機序は、十分には解明されていない。関節での骨破壊の面からの研究は多く、Hollander ら³⁾は、IgG とリウマトイド因子から成る免疫複合体を貪食した関節液中の好中球から放出されるライソゾーム酵素によって軟骨が破壊されると報告している。

また、Ugai⁴⁾は、RA 患者の摘出軟骨に好中球を加え

図3 RA患者滑液好中球の滑膜細胞傷害に及ぼすtrypsin inhibitorの影響

図4 RA患者滑液好中球の滑膜細胞傷害に及ぼすSOD+trypsin inhibitor, catalase+trypsin inhibitorの影響

て培養すると、好中球が軟骨深部に浸潤する像を認め、好中球による直接的な軟骨傷害を推測している。滑膜細胞を⁵¹Crで標識し、末梢血および滑液好中球、末梢血およびRA滑膜リンパ球を加え、滑膜細胞の傷害性をみると、RA患者の滑液中好中球がもっとも強い傷害性を示すことを以前に報告^{2,7)}した。また、今回と同様の実験方法で、48時間後の形態学的傷害を検討した結果では、RA患者の滑液好中球がもっとも強い滑膜細胞傷害性を示し、RA患者末梢血および滑液リンパ球には、傷害性がまったく認められないことも報告した^{5,6)}。

これらの成績から、滑膜細胞傷害には、滑液好中球が強く関与することがうかがわれたので、今回、好中球がだすいかなる因子が、この滑膜細胞傷害性に関係するかを抑制剤を用いて検討した。

その結果、SODはまったく抑制せず、catalaseもほとんど抑制を示さなかった。このことから、好中球の滑膜細胞傷害には、O₂やH₂O₂などの活性酸素はあまり関与しないものと考えられた。ところが、TIにより、好中球の滑膜細胞傷害性は強く抑制されたことから、好中球がだす傷害因子の主なものは蛋白分解酵素であると

考えられた。さらに、catalase と TI 同時に作用させることにより、好中球の細胞傷害性がほぼ完全に抑制されたことから、 H_2O_2 は直接的な滑膜細胞傷害作用は示さなくても、蛋白分解酵素による傷害作用を増強する作用を持つと考えられた。

以上の成績から、滑液好中球が滑膜組織の破壊に関与し、それから蛋白分解酵素が主な傷害因子であることが推測された。それゆえ、滑膜炎の治療に蛋白分解酵素阻害剤の使用も考慮されうる。一方、滑膜組織の増殖については、リンパ球から滑膜細胞増殖因子が関与することを以前に示した⁸⁾。滑膜炎の機序としては、このように滑膜の破壊と増殖の両面を考慮する必要がある。

結 語

RA 患者から得られた培養滑膜細胞に対し、RA 患者滑液中の好中球が強い傷害性を示し、細胞数の減少をもたらした。この傷害性因子は、好中球から遊離される蛋白分解酵素が主因子であると考えられた。

文 献

- 1) 大原守弘, 黒沢正喜, 迎 慎二, 白土雅美, 宮田昌之, 佐久間博史, 熊川宏美, 七宮 実, 吉田浩, 粕川禮司, 松本 淳: 慢性関節リウマチ患者末梢血リンパ球および好中球の滑膜細胞に対する細胞障害. 炎症 3: 242-243, 1983.
- 2) 大原守弘, 大庭 敬, 猪狩 雪, 関本静一, 橋本長吉, 五十嵐 哲, 小橋主税, 宮田昌之, 吉田浩, 粕川禮司, 千葉勝美, 松本 淳: 慢性関節リウマチ患者の関節液リンパ球および好中球の滑膜細胞に対する細胞障害性. 医学のあゆみ 132: 311-312, 1985.
- 3) Hollander, J.L., McCarty, D.J., Jr., Astorga, G. et al.: Studies on pathogenesis of rheumatoid joint inflammation "I The RA Cell" and a working hypothesis. Ann Intern. Med. 62: 271, 1965.
- 4) Ugai, K., Ishikawa, H., Hirohata, K., Shirane, H.: Interaction of polymorpho-nuclear leukocytes with immune complexes trapped in rheumatoid articular cartilage. Arthritis Rheum. 26: 1434-1441, 1983.
- 5) 大原守弘, 粕川禮司: 慢性関節リウマチ (RA) 患者関節液好中球による関節滑膜細胞傷害性. 関節外科 4: 155-157, 1985.
- 6) 大原守弘, 粕川禮司: 関節炎における顆粒球. 臨床免疫 17: 822-829, 1985.
- 7) 大原守弘, 大庭 敬, 猪狩 雪, 橋本長吉, 近藤祐一郎, 五十嵐 哲, 小橋主税, 宮田昌之, 吉田浩, 粕川禮司, 松本 淳: 慢性関節リウマチ患者の滑膜浸潤リンパ球の滑膜細胞障害性と NK および ADCC 活性. 炎症 5: 17-19, 1985.
- 8) 大原守弘, 大庭 敬, 猪狩 雪, 橋本長吉, 近藤祐一郎, 寺島久美子, 関本静一, 吉田 浩, 粕川禮司, 千葉勝美, 松本 淳: 慢性関節リウマチ患者関節液による滑膜培養細胞の増殖抑制作用. 炎症 5: 233-236, 1985.