コ ラ ー ゲ ン 関 節 炎

——Cyclosporin A の影響；第2報——

山口赤十字病院整形外科

佛 淵 孝 夫

九州大学医学部整形外科

貝 原 信 紘・香 月 一 朗

高 岸 憲 二

Collagen-Induced Arthritis

——Effect of Cyclosporin A; Second Report——

by

Takao Hotokebuchi

Department of Orthopedic Surgery,
Yamaguchi Red Cross Hospital

Nobuhiro Kaibara, Ichiro Katsuki and Kenji Takagishi

Department of Orthopedic Surgery, Faculty of Medicine,
Kyushu University

The effect of the immunosuppressive agent Cyclosporin A (CS-A) on collagen-induced arthritis was investigated in Sprague-Dawley rats. Treatment of CS-A in induction phase of type-II collagen immunization suppressed the development of arthritis as well as antibody titers and delayed-type hypersensitivity (DTH) skin reactions to type II collagen, possibly by interfering with helper T cells.

However, treatment of CS-A in preclinical phase enhanced significantly the arthritis and DTH skin reaction with suppression of antibody titers, possibly by interfering with suppressor T cells.

Treatment of CS-A in established arthritis enhanced or did not affect the lesions accompanied by an augmentation of DTH skin reactions.

These paradoxical effect of CS-A to collagen-induced arthritis might be caused by the balance of two regulatory subpopulation of T cells, helper T cells and suppressor T cells.

は じ め に

コラーゲン関節炎は慢性関節リウマチの新しい実験モデルとして注目されているが、発症のメカニズムについて不明な点が多い。

我々はこれまでに発症の高率化・抗コラーゲン抗体価の時間的推移・Macrophage suppressant agents の影響について検討を行い報告して来た。今回、T cell とりわけ helper T cell の特異的阻害剤である Cyclosporin A の投与により興味ある結果が得られ

たので報告する。

目 的

コラーゲン関節炎の発症のメカニズムを知る一つの手がかりとして helper T cell の特異的な阻害剤である Cyclosporin A (以下 CS-A と略す) のコラーゲン関節炎に対する影響についての検討。

材 料

6～7週令、雌 SD ラット。

方 法

Trentham らの方法によって、牛関節軟骨より抽出した II 型コラーゲンを oil emulsion として SD ラットの背部及び尾根部に皮下注射し Table I に示す結果が得られた。約 85% の高率発症を呈するコラーゲン 1.5 mg 投与の条件下でオリーブ油に溶解した CS-A を経口投与し、オリーブ油のみを投与した群を対照群とした。コラーゲン 1.5 mg で免疫した日を 0 日とし、発症日・発症率・Arthritic index の最大値・enzymelinked immunoassay system による抗コラーゲン抗体価・DTH skin reaction の測定検討をおこなった。

結 果

Table II に 0-13 日までの連続投与の結果を示す。尚、Antibody level は 21 日目に 3 万倍希釈の血清を enzyme-linked immunoassay system による 410 nm での吸光度により表示し、DTH skin reaction は induration (単位は mm) で表示した。5 mg/kg 投与群ではオリーブ油を投与した対照群とは有意差に認めなかったが、25 mg/kg 及び 15 mg/kg 投与群では発症は完全に抑制され、Antibody level, DTH skin reaction とも有意に低値を示した。

Table III に 0-6 日までの連続投与の結果を示す。発症率については対照群が 14/15 (93%) であったのに対して、25 mg/kg 投与群で 2/16 (13%)、15 mg/kg 投与群で 4/18 (22%) と有意に抑制を認めた。また発症日については有意差はなかったが、Arthritic index, Antibody level, DTH skin reaction とも有意に低値を示した。

Table IV は 7-13 日までの連続投与である。50, 25, 15 mg/kg 投与群でいずれも 100% の発症率となり、発症日と 15 mg/kg 投与群の Arthritic index は有意差を認めなかったが、他の Arthritic index と DTH skin reaction は高値を、Antibody level は逆に低値を示した。

Table V は既存の関節炎に対する CS-A の影を軍検討するために 14-20 日までの連続投与を行った結果である。Antibody level では有意差を認めなかったが、DTH skin reaction と 50 mg/kg 投与群の Arthritic index は高値を示した。

考 察

新しい免疫抑制剤として臓器移植などの分野で注目を集めている Cyclosporin A (CS-A) のコラーゲン関節炎に対する影響について検討を行い、Table II ~ V の結果が得られた。CS-A は最初抗真菌剤として用いられていたものであるが 1976 年 Borel らによって、免疫抑制作用があることが発見された。その後の研究で CS-A の作用機序としては、induction phase での helper T cell の阻害剤であるとの報告が多い。そこで Table II, III に示した induction phase での投与群と Table IV に示した preclinical phase (あるいは effector phase) での投与群、さらに Table V に示した既存関節炎に対する投与群の 3 つの群に分けて検討を加えることにする。

induction phase (Table II, III) での投与群では発症率のみならず液性及び細胞性免疫反応も抑制された。これは CS-A が T cell を介して細胞性のみならず液性免疫反応をも抑制した結果であると考えられる。したがってこの結果より T cell-mediated process がコラーゲン関節炎の発症に重要な役割を果たしていることが考えられる。

しかしながら preclinical phase での投与群 (Table IV) では発症率が 100% となり、液性免疫反応は抑制され、細胞性免疫反応は増強するという興味ある結果となった。この結果は 0-6 日の投与群 (Table III) と全く逆の結果であり、CS-A はコラーゲン関節炎に対しては投与時期により相反する作用を及ぼしたことになる。この現象は CS-A が helper T cell のみに特異的に作用するとすれば説明しにくい。preclinical phase では suppressor T cell がより抑制され、相対的に helper T cell が dominant となったと考えると説明しやすい。実際、最近の Palacios らの報告によれば CS-A が従来言われているように、induction phase での helper T cell のみならず、suppressor T cell をも阻害するという。したがって、コラーゲン関節炎に対する preclinical phase での CS-A の増強作用は CS-A による suppressor T cell の抑制によるものと考えられる。

既存の関節炎に対する CS-A の投与は臨床的にも Graf らの報告にあるように試みられてはいるが、治療効果は認められていない。今回の実験でも Table

Table 1 *Effect of the Immunizing Dose of Type II Collagen on the Production of Arthritis*

Type II collagen mg	Incidence of arthritis*	Number of rats with polyarthritis scoring:			
		0	1-5	6-10	11-16
0.5	15/30 (50%)	15	10	5	0
1.5	28/33 (85%)	5	15	12	1
3.0	9/10 (90%)	1	6	3	0

* Number of rats with arthritis per number of rats tested.

Table II *Effect of CS-A Treatment (Days 0-13) on the Development of Collagen Arthritis*

	CS-A dose (mg/kg)			Olive oil
	25	15	5	
Incidence of arthritis	0/14*	0/14*	11/14 (79%)	12/14 (86%)
Arthritic index†	—	—	4.9±0.9	5.5±0.8
Day of onset§	—	—	11.0±0.6	10.4±0.4
Antibody level	0.01#	0.01**	0.66±0.13	0.90±0.14
DTH skin reaction‡‡	3.3±0.6§§	3.2±0.9	5.4±0.5	5.7±0.4

* $P < 0.002$ vs. the group.

† Expressed as the mean of maximum arthritic indices±SEM.

§ Based on arthritic rats only (mean±SEM)

|| Antibody levels to type II collagen were measured using enzyme-linked immunoassay system on day 21 and expressed in absorbance values at 410 nm (mean±SEM). A serum dilution of 1:30,000 was used for detection of antibodies.

$P < 0.001$ vs. the oil group.

** $P < 0.005$ vs. the oil group.

‡‡ On day 25; expressed as the mean±SEM diameter of insuratin (mm).

§§ $P < 0.01$ vs. the oil group.

||| $P < 0.02$ vs. the oil group. For all the other parameters depicted in this table, the differences between the groups were not significant.

Table III *Effect of CS-A Treatment (Day 0-6) on the Development of Collagen Arthritis**

	CS-A dose (mg/kg)		Olive oil
	25	15	
Incidence of arthritis	2/16 (13%)	4/18 (22%)†	14/15 (93%)
Arthritic index	10.3±0.2§	1.0±0.5§	6.1±0.8
Day of onset	13.5±2.5	15.0±2.8	11.4±1.0
Antibody level	0.15±0.04§	0.22±0.08§	1.04±0.10
DTH skin reaction	3.6±0.4	4.2±0.4#	5.7±0.2

* Parameters and units are identical to those described in Table II.

† $P < 0.002$ vs. the oil group.

§ $P < 0.001$ vs. the oil group.

|| $P < 0.005$ vs. the oil group.

$P < 0.02$ vs. the oil group. For all the other parameters depicted in this table, the differences between the groups were not significant.

V に示すように Antibody level では有意差を認められなかったが、DTH skin reaction は有意に高値を示し、また 50 mg/kg 投与群では Arthritic in-

dex が有意に高値を示した。つまり治療効果を認めず、むしろ増強傾向を示したが、この結果も suppressor T cell の抑制によるものと考えられる。

Table IV Effect of CS-A Treatment (Days 7-13) on Collagen Arthritis

	CS-A dose (mg/kg)			Olive oil
	50	25	15	
Incidence of arthritis	19/19	20/20	8/8	14/16 (88%)
Arthritic index	9.7±0.7*	9.3±1.0‡	7.6±1.0	5.8±0.7
Day of onset	9.9±0.3	9.8±0.3	11.5±1.0	10.1±0.4
Antibody level				
Day 15	0.47±0.06§	0.57±0.07	ND#	0.84±0.08
Day 21	0.51±0.07*	0.72±0.08	0.59±0.11	1.03±0.12
DTH skin reaction	7.0±0.4‡	7.0±0.2‡	7.1±0.4	5.5±0.4

Parameters and units are identical to those described in Table II.

* $P < 0.001$ vs. the oil group.

‡ $P < 0.02$ vs. the oil group.

§ $P < 0.005$ vs. the oil group.

|| $P < 0.05$ vs. the oil group. For all the other parameters depicted in this table, the differences between the groups were not significant.

Not done.

Table V Effect of CS-A Treatment (Days 14-20) on the Established Lesions of Collagen Arthritis

	CS-A dose (mg/kg)		Olive oil
	50	25	
Number of rats tested	14	15	15
Arthritic index	10.4±1.1*	9.3±1.1	7.5±0.7
Antibody level	0.88±0.11	0.96±0.11	1.07±0.12
DTH skin reaction	7.6±0.4‡	7.5±0.4‡	5.3±0.6

Parameters and units are identical to those described in Table II.

* $P < 0.05$ vs. the oil group.

‡ $P < 0.02$ vs. the oil group. For all the other parameters depicted in this table, the difference between the groups were not significant.

結 語

T cell の特異的阻害剤である Cyclosporin A のコラーゲン関節炎に対する影響について検討を行い、0-6 日及び 0-13 日の連続投与では発症率が 100% となり逆に増強効果を認めた。これは suppressor T cell が抑制され相対的に helper T cell が dominant となったためと推察された。

既存の関節炎については Cyclosporin A の投与では認められなかった。

参 考 文 献

- 1) Borel, J. F., C. Feurer, H. U. Gubler, and H. Stähelin: Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions*. 6: 468-475, 1976.
- 2) Borel, J. F., C. Feurer, C. Magnée, and H. Stähelin: Effects of the new antilymphocytic peptide cyclosporin A in animals. *Immunology*. 32: 1017-1025, 1977.
- 3) Graf, U., U. Marbet, W. Müller, and G. Thiel: Cyclosporin A — Wirkungen und nebenwirkungen bei der behandlung der chronischen polyarthritis und der psoriasisarthritis. *Immun. Infekt.* 9: 20-27, 1981.
- 4) Palacios, R: Cyclosporin A inhibits the proliferative response and the generation of helper, suppressor and cytotoxic T-cell functions in the autologous mixed lymphocyte reaction. *Cell. Immunol.* 61: 453-462, 1981.
- 5) Stuart, J. M. M. A. Cremer, A. H. Kang, and A. S. Townes: Collagen-induced arthritis in rats: evaluation of early immunologic events. *Arthritis Rheum.* 22: 1344-1351, 1979.
- 6) Trentham, D. E. A. S. Townes, and A.

- H. Kang: Autoimmunity to type II collagen: an experimental model of arthritis. *J. Exp. Med.* 146: 857-868, 1977.
- 7) Trentham, D. E: Collagen arthritis as a relevant model for rheumatoid arthritis: evidence pro and con. *Arthritis Rheum.* 25: 911-916, 1982.
- 8) Trentham, D. E. A. S. Townes, A. H. Kang, and J. R. David: Humoral and cellular sensitivity to collagen in type II collagen-induced arthritis in rats. *J. Clin. Invest.* 61: 89-96, 1978.
- ~~~~~