

## 少量の gold sodium thiomalate を投与した 慢性関節リウマチ罹患関節滑膜組織の検討

—金粒子の局在および投与前後の  
滑膜内血管内皮細胞の変化—

新潟大学医学部整形外科学教室（主任：田島達也教授）

若槻秀夫

A Histological Investigation of the Rheumatoid  
Synovial Membrane Treated with Small Dosis  
of Gold Sodium Thiomalate

—With Special Reference to the Localization of  
Gold and Morphological Change in Vascular  
Endothelial Cells of Synovial Membrane—

Hideo WAKATSUKI, M.D.

*Dept. of Orthopaedic Surgery,  
Niigata University School of Medicine  
(Director: Prof. Tatsuya TAJIMA)*

Localization of gold particles and the shapes formed by their conglomeration were investigated in RA-afflicted articular synovia of 31 cases after administration of small dosis of gold sodium thiomalate (GST) (in 23 cases less than 10 mg and in 8 cases less than 25 mg at a time were administered) with electron probe microanalyzer and electron microscope. In 9 cases in which less than 10 mg of GST at a time was administered and synovial biopsies before and after administration of GST were performed, relation between clinical finding with Lansbury index as its parameter, synovial histology, localization and the shapes of gold particles was investigated. Furthermore, the observation that proliferation of cultured endothelial cells of umbilical veins was inhibited by administration of small dosis of GST having taken into consideration, vascular density of superficial synovial layer and morphological change of EC were measured, which led to the following conclusion.

1. Gold particles were mostly found in lysosomes of macrophages located in deeper layer of articular synovia in contract to cases with administration of greater

Reprint request to: Hideo WAKATSUKI,  
Dept. of Orthopaedic Surgery, Niigata  
University School of Medicine,  
Asahimachi dori-1, Niigata City, 951 JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1  
新潟大学医学部整形外科学教室内  
若槻秀夫

dosis of GST where they were said to be found mostly in lining cells of synovia. However, no marked difference in the shape of precipitated gold particles was observed.

2. Lansbury index coincided with histological change in 8 of 9 cases, but not with localization and shape of gold particles.
3. Vascular density in the superficial layer of articular synovia after administration of GST increased in cases with progressing histological change, but did not decrease in cases with improving histology.
4. Decrease in the height of EC, shrinkage and flattening of nuclei were seen in all cases after administration of GST.
5. Findings above described seemed to suggest that GST inhibited synovitis by causing flattening of EC, rather than inhibition of new vascular formation.

Key words: Rheumatoid arthritis, gold sodium thiomalate, synovial membrane, vascular endothelial cell.

慢性関節リウマチ, 金製剤, 滑膜, 血管内皮細胞.

## I. はじめに

慢性関節リウマチ(以下 RA)治療体系の中で広範に用いられている金療法は重要な位置を占めているが, その作用機序については, コラーゲンの cross-linkage の形成促進<sup>1)</sup>, ライソゾーム酵素の抑制<sup>2)</sup>, 補体活性化の抑制<sup>3)</sup>, プロスタグランジンの生合成の抑制<sup>4)</sup>, 食細胞の貪食抑制<sup>5)</sup>, リンパ球の芽球化抑制<sup>6)</sup>, 血管内皮細胞抑制<sup>7)</sup> など種々の仮説が提唱されていて未だ結論は得られていない。

Gold sodium thiomalate (以下 GST) の使用法は従来の1~2週に1回 50mg の大量投与の時代から1回 25mg さらに副作用が少なく長期継続投与可能な1回 5~10mg の少量投与の時代へと変わり, 臨床的にもこの少量投与法の有効性が認められるようになった<sup>8)</sup>。

金の関節内注入や大量筋注を受けた RA 患者の関節滑膜内金粒子は 1966年 Norton ら<sup>9)</sup>により初めて表層細胞で観察され, ついでこれに加えて滑膜下層のマクロファージ<sup>10)11)12)13)</sup>, 線維芽細胞<sup>10)13)</sup>にも沈着すると報告された。しかし, 少量 GST 投与例での関節滑膜内金粒子の検討は行われていない。また同一症例での GST 投与前後の関節滑膜採取による検討は Gadialy ら<sup>11)</sup>の 5例, Walters ら<sup>14)</sup>の 3例の報告にみられるが, 前者は主に GST 投与後の関節滑膜内金粒子の検討であり, 後者は GST 投与前後における関節滑膜リンパ球分画, クラス II 抗原と臨床所見の関係を検討したもので, 経時

的な組織像変化や関節滑膜内金粒子局在と臨床的効果との比較検討については行われていない。著者は, Matsu-  
bara ら<sup>7)</sup>の報告した GST を加えた臍帯の血管内皮細胞培養実験で, 血管内皮細胞の増殖が抑制されるという事実を重視しているが, GST を投与された RA 患者の関節滑膜組織内の血管内皮細胞の経時変化についての報告はない。

そこで少量投与された GST の作用機序を解明する目的で, GST 少量投与例における関節滑膜内金粒子の局在および形態の検討を行った。また GST 投与前および投与後経時的に関節滑膜を採取できた症例で Lansbury index を指標とする臨床所見, 関節滑膜組織像, 金粒子の局在および形態の関係について検討した。さらに血管密度の計測および血管内皮細胞の形態計測を行い GST 投与前後の滑膜内血管の変化を検討した。

## II. 症例の概要と研究方法

### A. 症例の概要

アメリカリウマチ学会の診断基準(1958)に従い definite または classical RA と診断された患者で, GST 初回使用の31例(表 I)を検討対象とした。その内訳は性別, 男4例, 女27例, 年齢は16歳から77歳で60歳台が13例39%と多く, 罹病期間は3カ月から最長38年で5年未満が16例52%と約半数を占めている。RA テストは28例90%が陽性で, stage 分類では II, III が24例77%, class 分類では 2, 3 が28例90%と大多数を占めていた。

表 1 対 象

症例	性別	年齢	罹病期間	RA	STAGE	CLASS	採取関節
1	F	56	16y	+	Ⅲ	2	膝
2	F	57	13y	+	Ⅲ	3	膝
3	F	16	3m	-	Ⅱ	2	膝
4	F	62	2y 3m	+	Ⅱ	3	膝
5	F	58	37y	+	Ⅲ	3	膝
6	F	42	6m	2+	Ⅰ	2	膝
7	F	76	7m	+	Ⅱ	2	膝
8	F	63	2y 3m	+	Ⅲ	3	膝
9	M	69	3m	+	Ⅱ	3	膝
10	F	68	6m	+	Ⅱ	1	膝
11	F	65	2y	2+	Ⅲ	3	膝
12	F	77	38y	+	Ⅳ	4	膝
13	F	19	3y	+	Ⅱ	2	膝
14	F	70	2y	+	Ⅲ	3	膝
15	F	67	11y 3m	2+	Ⅲ	3	膝
16	M	60	4m	+	Ⅰ	3	膝
17	F	61	10y	+	Ⅲ	2	手
18	F	52	5y 3m	+	Ⅲ	3	膝
19	F	61	12y	+	Ⅱ	2	膝
20	M	45	4y	+	Ⅰ	2	膝
21	M	56	2y	+	Ⅲ	3	膝
22	F	62	7y	+	Ⅲ	3	膝
23	F	57	22y	2+	Ⅳ	3	膝
24	F	36	1y	-	Ⅱ	3	膝
25	F	76	22y	+	Ⅲ	3	膝
26	F	38	6y	+	Ⅲ	2	膝
27	F	61	5y	+	Ⅲ	2	膝
28	F	36	18y	2+	Ⅳ	2	手
29	F	27	2y	-	Ⅰ	2	膝
30	F	60	3y	2+	Ⅲ	2	肘
31	F	63	6y	2+	Ⅲ	2	手
I	F	56			OA		膝
II	F	62			OA		膝
III	F	67			OA		膝
IV	F	22			AC		膝
V	F	20			AC		膝

(注) OA: 変形性膝関節症, AC: 前十字靭帯断裂

また非炎症性関節疾患 (non inflammatory joint disease, 以下 NIJD) として変形性膝関節症 3例, 前十字靭帯断裂 2例計 5例を対照群とした。

## B. 研究方法

### 1. 関節滑膜採取部位

RA 31例中27例および NIJD 5例は, 生検あるいは

手術時に膝関節の膝蓋骨周囲から関節滑膜を採取し, 残り RA 4例は手関節または肘関節から採取した。

### 2. 標本採取時期

GST 投与法, 標本採取時の投与期間, 総投与量は表 2 に示した通りである。全例 1回 25mg 以下の少量投与例 (筋注) で, 症例 1~23 の 1回投与量が 5ないし 10mg 投与群 (以下 5-10mg 投与群), 症例 24~31 の経過中または生検時に 1回投与量が 20ないし 25mg 投与群 (以下 20-25mg 投与群) の 2群に分けて検討した。

症例 1~9 は GST 投与開始直前に第 1回目関節滑膜生検を行い, 表 2 に示した量と期間の少量投与後に第 2回目生検を, さらに症例 7, 9 では第 3回目生検を同一関節で行った。

### 3. 標本作成

関節滑膜組織は, 10%ホルマリン固定後, 通常の操作でパラフィン切片を作成し HE 染色を行った。同時に, 1%パラホルムアルデヒド・1%グルタルアルデヒド (0.1M カコジル酸緩衝液 pH 7.2) 混合固定あるいはこれを前固定とし, 1%オスミウム酸 (0.1M カコジル酸緩衝液 pH 7.2) 後固定を施し, アセトン系列脱水後エポン 812ブロックを作成した。

### 4. 血清金濃度と GST 総投与量の検討

血清金濃度は条件を一定化するために標本採取前, GST 投与直前の最も低濃度となるときに採血し, 原子吸光法により測定し, GST 総投与量と金粒子の関係を検討した。

### 5. 金粒子の検討

#### a. 波長分散 X線微小分析 (electron probe micro-analyzer, 以下 EPMA) による金粒子分布, 局在の検討

金粒子を電顕で検索したが 5-10mg 投与群では, なかなか見つからないため, 電顕切片用に小さくトリミングする前のエポン切片を用い広い範囲で金粒子を検索した。電顕用エポンブロックから 1 $\mu$  電顕観察用切片を薄切し, ついでこれと連続して 2 $\mu$  切片を薄切した。この切片をカーボン台に載せ, 10%水酸化カリウムメタノール溶液で脱エポン操作後充分水洗, 乾燥後カーボン蒸着を行い, 試料とした。島津 EMA-SM 型を使用し, 加速電圧 10KV, 試料電流 0.08 $\mu$ A, 650 倍で Au M $\alpha$  線をモニターしながら aero view 分析, 加速電圧 10KV 試料電流 0.1 $\mu$ A, 同倍率で画分析を行い, 金粒子の分布を広い範囲で検索した。同時に同倍率の走査電顕像を連続切片の光顕像と比較することにより局在の検討を行った。

## b. 電顕的検討 (含エネルギー分散微小分析)

EPMA で Au 陽性部位を中心にエポブロックをトリミングし、超薄切した。酢酸ウラニルエタノール溶液とクエン酸鉛による二重電子染色、クエン酸鉛単染色を施したものおよび電子染色を行わないものを日立 H 300 電顕を使用し、組織所見を観察するとともに金粒子を検索した。金の同定のため、日立 H 500 走査透過電顕に KeveX 7000 エネルギー分散微小分析装置を装着し、電顕像を観察しながら微小分析を行い、細胞内金粒子の局在を検索した。

## 6. 経時生検例の臨床所見と組織像変化の検討

## a. 臨床所見評価

臨床所見の指標として、朝のこわばり持続時間、握力、赤沈1時間値、関節点数の4項目を総合評価した Lansbury index を用いた。

## b. 組織炎症所見の評価

パラフィン切片 HE 染色および1 $\mu$ エポン切片メチレンブルーアズールII染色標本で、①絨毛増生 ②血管増生 ③表層細胞増生 ④細胞浸潤 ⑤フィブリノイド変性の各項目を4段階評価し、組織炎症所見の指標とした。

## c. 関節滑膜血管密度の計測法

関節滑膜血管の密度は部位により異なる。各標本間の計測条件を一定にするために関節滑膜表層から300 $\mu$ 以内の血管密度を計測した。光顕切片の100倍拡大写真を貼り合わせ、標本全体を再現し、写真上で関節滑膜表層から300 $\mu$ 以内の範囲を設定し面積を測定した。ついで光顕像を観察しながら写真上の血管に印をつけ、血管腔数を血管数として求め、計測した面積で除して血管密度を求めた。

## 7. 血管内皮細胞形態計測法

1 $\mu$ 薄切エポン切片にメチレンブルーアズールII染色を施し、表層から300 $\mu$ 以内の範囲の毛細血管および外長径50 $\mu$ 以下の小静脈を無作為に1検体40本抽出し計測した。小動脈は固定操作で収縮し内皮形態が変化するため、計測から除外した。光顕像を OLYMPUS SPICCA-500 画像解析システムに入力し、以下の値を算出した。

## a. 平均周長および平均血管内皮高

血管内皮外周をトレースしその面積 ( $A_1$ ) 周長 ( $P_1$ ) を、同様に内周をトレースし内腔の面積 ( $A_2$ ) 周長 ( $P_2$ ) を求めた。これらより以下の値を求め血管の大きさ、および内皮細胞の腫大の指標とした。

$$\text{平均周長 } (\mu) = (\text{外周長} + \text{内周長}) / 2$$

$$= (P_1 + P_2) / 2$$

$$\begin{aligned} \text{平均血管内皮高 } (\mu) &= \text{内皮面積} / \text{平均周長} \\ &= 2(A_1 - A_2) / (P_1 + P_2) \end{aligned}$$

## b. 核の断面積および平均核幅

血管内皮細胞核をトレースし、内皮細胞核の面積 ( $A_3$ ) 長径 ( $D_3$ ) を求めた。これらより以下の値を求め核の腫大の指標とした。

$$\text{核断面積 } (\mu^2) = A_3$$

$$\begin{aligned} \text{平均核幅 } (\mu) &= \text{核断面積} / \text{核長径} \\ &= A_3 / D_3 \end{aligned}$$

## III. 結 果

## A. 血清金濃度と gold sodium thiomalate 総投与量の検討

表2に対象症例毎のGST総投与量、投与方法、投与期間および血清金濃度を示した。GST総投与量と血清金濃度の関係を31例でみたが両者に相関はみられなかった。毎週10mg投与を継続している13例に限定して検討しても、両者に相関はみられなかった。症例24~28の以前毎週20ないし25mg投与を受け現在は1回10mg投与を受けている例の血中濃度は症例1~23の5~10mg投与群と同様に低値を示していた。

## B. 金粒子の局在および形態

5~10mg投与群のEPMA分析では金の分布には偏りがみられ、1視野中数カ所に金が検出された部位もあるが大多数の視野では金は検出されなかった。金は関節滑膜表層にはみられず主に100 $\mu$ 以上深層にみられた(図1a)。光顕切片と対応させて分布を見ると、金は表層細胞やリンパ球の集簇部位にみられることは少なく、むしろ細胞が比較的疎に分布している部分あるいは血管周囲のマクロファージ、形質細胞等が混在する部位にみられた。

金の出現は総投与量の増加と共に多くなる傾向がみられた。5mg投与の症例2, 9および10mg投与例のうち総投与量が60mg以下の症例10, 11, 12の合計5例では金は検出できなかった(表2)。

電顕で見ると金粒子は関節滑膜下層のマクロファージのライソゾーム内に淡い羽毛状、毛髪状あるいは粒子状に沈着していたが、表層細胞には見られなかった。これらが金であることはエネルギー分散微小分析を用いて確認した(図2)。

20~25mg投与群では全例で金粒子を検出できた。EPMAによる分析では金の分布は5~10mg投与群と同様に偏りがみられたが、総投与量400mg以下の症例24,

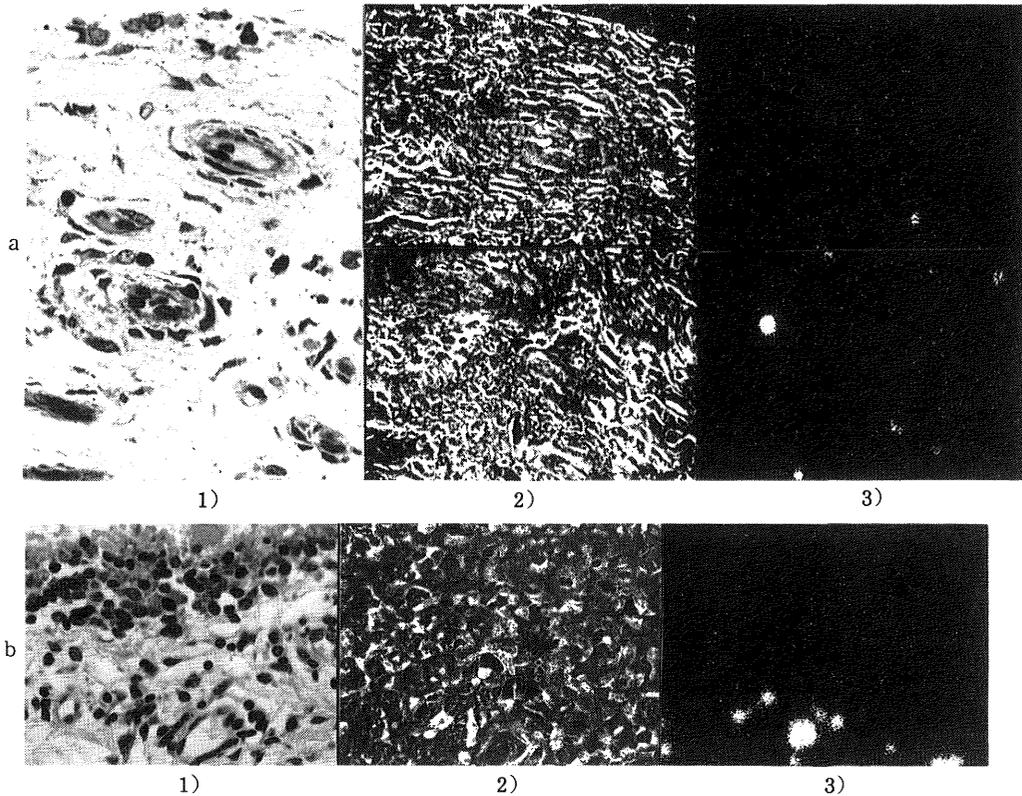


図 1 GST 投与後滑膜の金分布 (EPMA 面分析による)

a; 5-10mg 投与群 (症例 7, GST  $\Sigma$  360mg)

1) エポソ切片 (メチレンブルー-アズール II 染色  $\times$  325)

軽度の表層細胞の増生, 血管増生を認める. 細胞浸潤はほとんど見られない.

2) 1) の連続切片の走査電顕像 ( $\times$  325)

3) 2) と同一切片の EPMA 面分析による金の分布 ( $\times$  325)

本例分析中, 最も多く金の検出された部位.

1), 3) を比較すると金は表層にはみられず, 深層部に分布することがわかる.

b; 20-25mg 投与群 (症例 28,  $\Sigma$  4245mg,  $\times$  325)

EPMA 面分析は, 症例 7 の 1/4 の露出時間で撮影した. 金の量は明らかに多いが

1), 3) を比較すると分布は 5-10mg 投与群に類似している.

$\times$  650 の写真を 1/2 に縮小し掲載した.

25, 29を除くとその検出は 5-10mg 投与群に比べて容易だった. 金粒子の分布は図 1b のように 20-25mg 投与群でも関節滑膜表層よりむしろ深層にみられた. 光顕切片との比較では主に細胞成分の少ないところおよび各種炎症細胞の混在する部位にみられ, 関節滑膜表層部にみることは少なかった (図 1b).

電顕で見ると, 金粒子は関節滑膜下層のマクロファージのライソゾーム内に主にみられたが, 表層細胞のライソゾーム内にも散見された. 線維組織内の島状の細胞質内のライソゾームにも金粒子を認めたが, これらが線維

芽細胞の胞体とは断定できなかった. 金粒子の形態は諸家の報告<sup>9)10)11)12)13)</sup> のように毛髪状, 針状あるいは桿状を呈し, 時には大きな集合体を形成していた (図 3).

5-10mg 投与群と 20-25mg 投与群間では金粒子の出現頻度に大きな差があるが, 金粒子自体はともに直径 5-15nm の小粒子の集合であった.

### C. 関節滑膜光顕組織像の検討

GST 投与中の 31 症例 42 検体の RA 罹患関節滑膜の組織所見は症例により異なる像を呈していた. すなわち絨毛増生, 表層細胞の腫大, 重層化, フィブリノイド変

表2 研究対象とした症例毎の GST 総投与量と血清金濃度

症 例	総投与量 (mg)	投 与 法 (mg/w)	投与期間	血清金濃度 ( $\mu\text{g}/\text{dl}$ )	金未検出例
1-2	90	10/w	9w	38	
2-2	150	5/2w	60w	11	*
3-2	170	10/w	17w	72	
4-2	170	10/w	17w	66	
5-2	170	10/w	17w	69	
6-2	180	10/w	18w	35	
7-2	180	10/w→10/2w	26w	65	
-3	360	→10/2w	62w	87	
8-2	200	10/w→10/2w	28w	33	
9-2	270	10/w→10/2w	50w	20	*
-3	380	→0→5/4w	104w	36	*
10	40	10/w	4w	42	*
11	50	10/w	5w	88	*
12	60	10/w	6w	68	*
13	100	10/w	10w	91	
14	105	10/2w	24w	15	
15	120	10/w	10w	65	
16	140	10/w	14w	126	
17	140	10/w	14w	61	
18	310	10/2w	1y 6m	102	
19	360	10/2w	1y 8m	88	
20	395	10/w→5/2w→10/4w	2y 7m	32	
21	980	10/w	1y 10m	63	
22	1150	10/w→10/4w	6y 10m	10	
23	2120	10/w→10/2w→10/w	8y 8m	58	
24	300	20/w→10/w	18w	39	
25	400	10/w→25/w→10/w	28w	42	
26	1640	10/w→25/w→10/2w	2y 3m	38	
27	2580	10/w→25/w→10/w	2y 9m	54	
28	4245	25/2w→25/4w→10/4w	9y	51	
29	345	10/2w→25/2w	1y 3m	62	
30	950	25/w	38w	81	
31	2650	10/w→25/2w	4y 6m	135	

(注) -2: 第2回目生検, -3: 第3回目生検

性あるいはフィブリン様物質の沈着, 血管の増生, リンパ球, 形質細胞の浸潤, リンパ濾胞様構造等 RA の一般的特徴である組織所見のほとんど全てを示す関節滑膜 (図 4a, b, c) から, 組織所見では NIJD と区別できないほど炎症所見の見られない関節滑膜 (図 4b) までみられ, 症例により関節滑膜の炎症所見は異なっていた。血管増生は全例にみられたが, 絨毛増生, 表層細胞増生,

炎症細胞浸潤, フィブリノイド変性は症例により差がみられた。

増生した血管は様々の形態を呈していた。炎症細胞浸潤部位では, 血管内皮細胞が腫大した毛細血管ないし小静脈 (図 5a) がみられ, これらのうちリンパ球の集簇部位ではリンパ節等に見られるような高内皮小静脈と類似した血管内皮細胞が腫大し密に配列した小静脈がみら

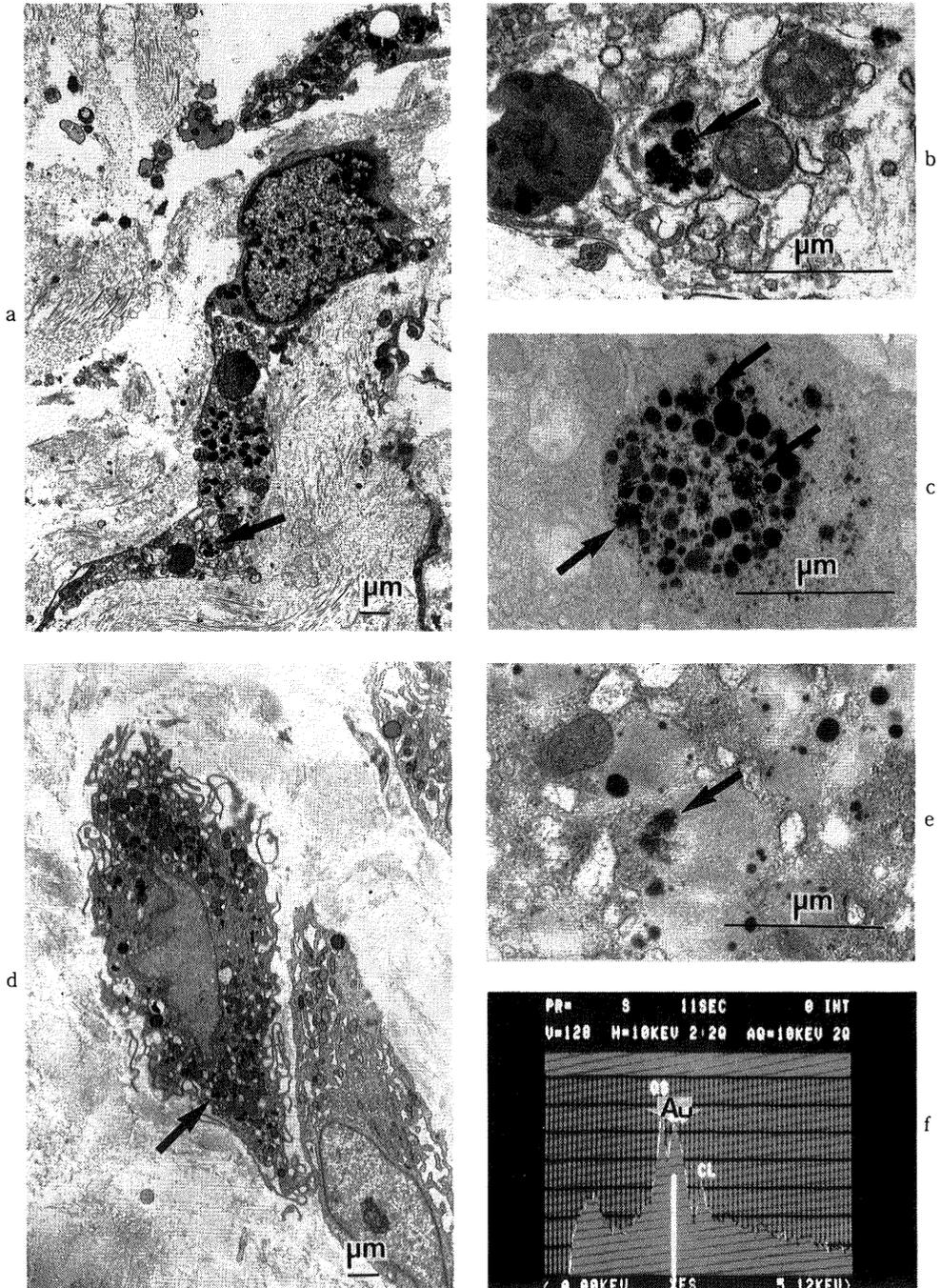


図 2 5-10mg 投与群における金粒子電顕像

- a; マクロファージのライソゾーム内の金粒子 (矢印) (症例 3).
- b; a の拡大. 顆粒状を呈している (矢印).
- c; マクロファージのライソゾーム内の毛髪状, 羽毛状金粒子 (矢印). 無染色でも電子密度が高い (症例 18).
- d; マクロファージのライソゾーム内金粒子 (矢印) (症例 8).
- e; d の拡大. 羽毛状を呈している (矢印).
- f; 金粒子のエネルギー分散分析.

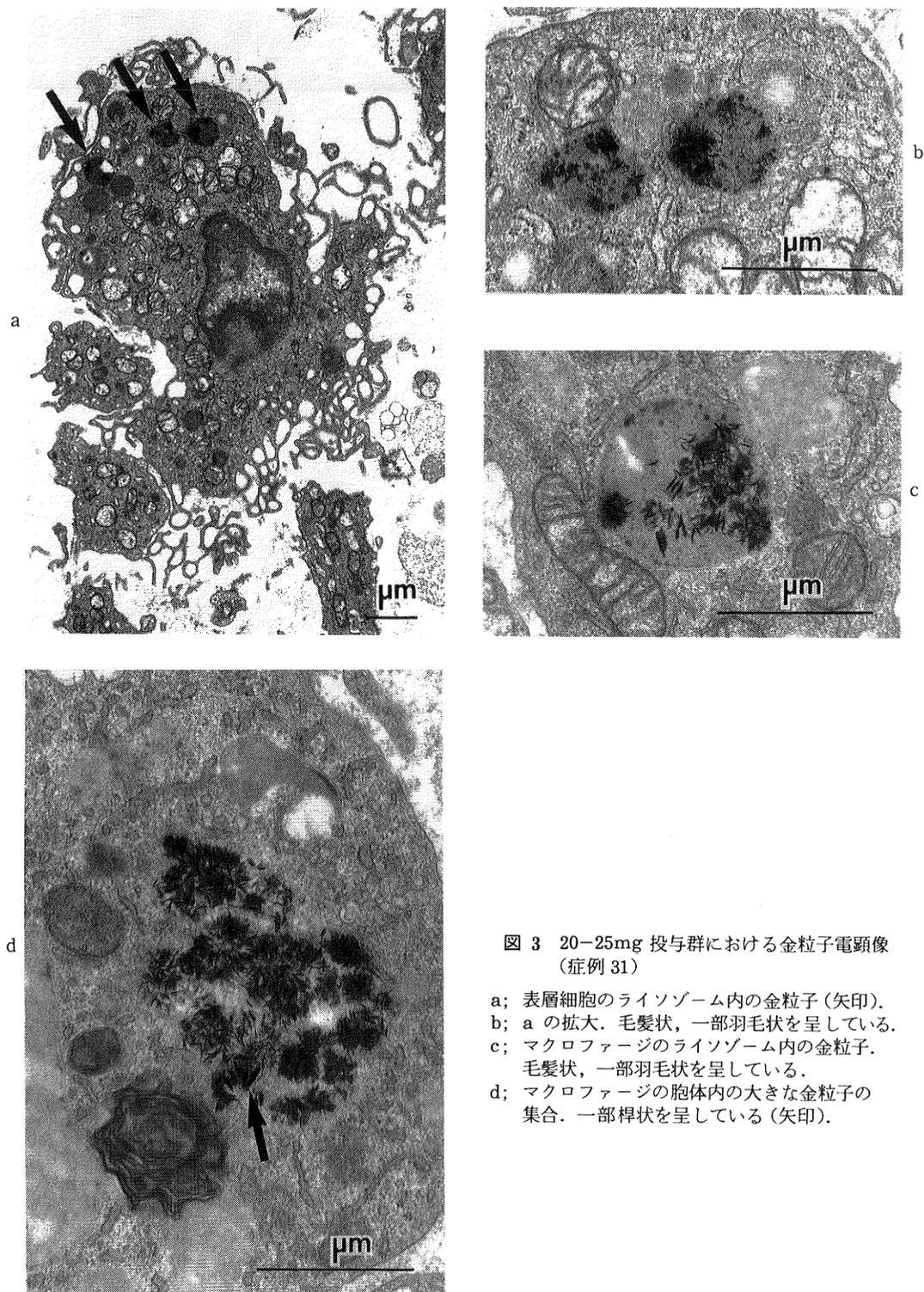


図3 20-25mg 投与群における金粒子電顕像 (症例31)

- a; 表層細胞のライソゾーム内の金粒子 (矢印).
- b; a の拡大. 毛髪状, 一部羽毛状を呈している.
- c; マクロファージのライソゾーム内の金粒子. 毛髪状, 一部羽毛状を呈している.
- d; マクロファージの胞体内の大きな金粒子の集合. 一部桿状を呈している (矢印).

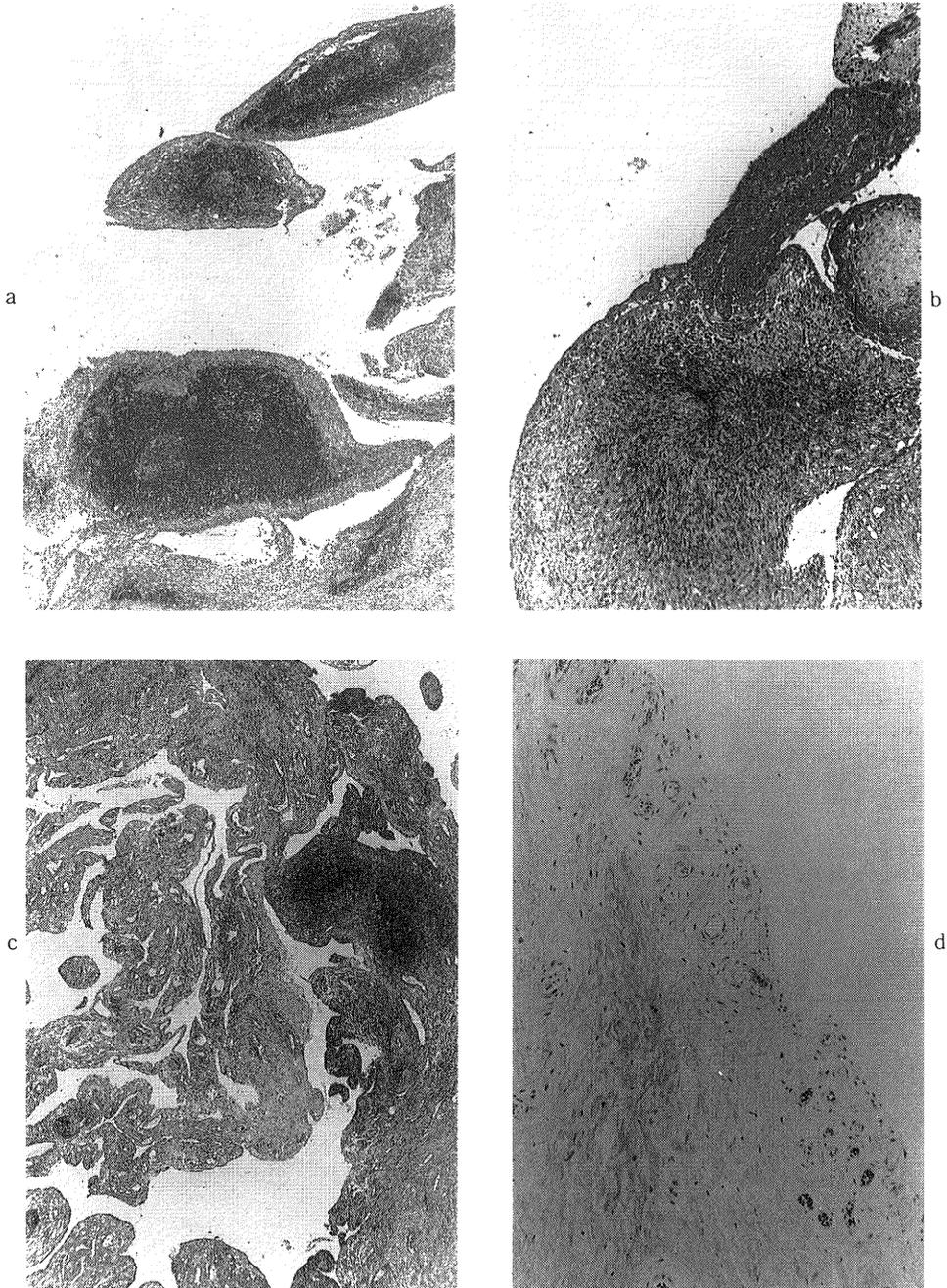


図 4 滑膜光顕組織像 (HE 染色)

- a; 表層細胞増生とリンパ濾胞様構造 (症例 31,  $\times 40$ ).
- b; フィブリノイド変性 (症例 31,  $\times 100$ ).
- c; 絨毛および血管増生 (症例 31,  $\times 40$ ).
- d; 軽度の血管増生のみ RA 滑膜. NIJD と区別がつかないほど炎症所見に乏しい (症例 2,  $\times 100$ ).

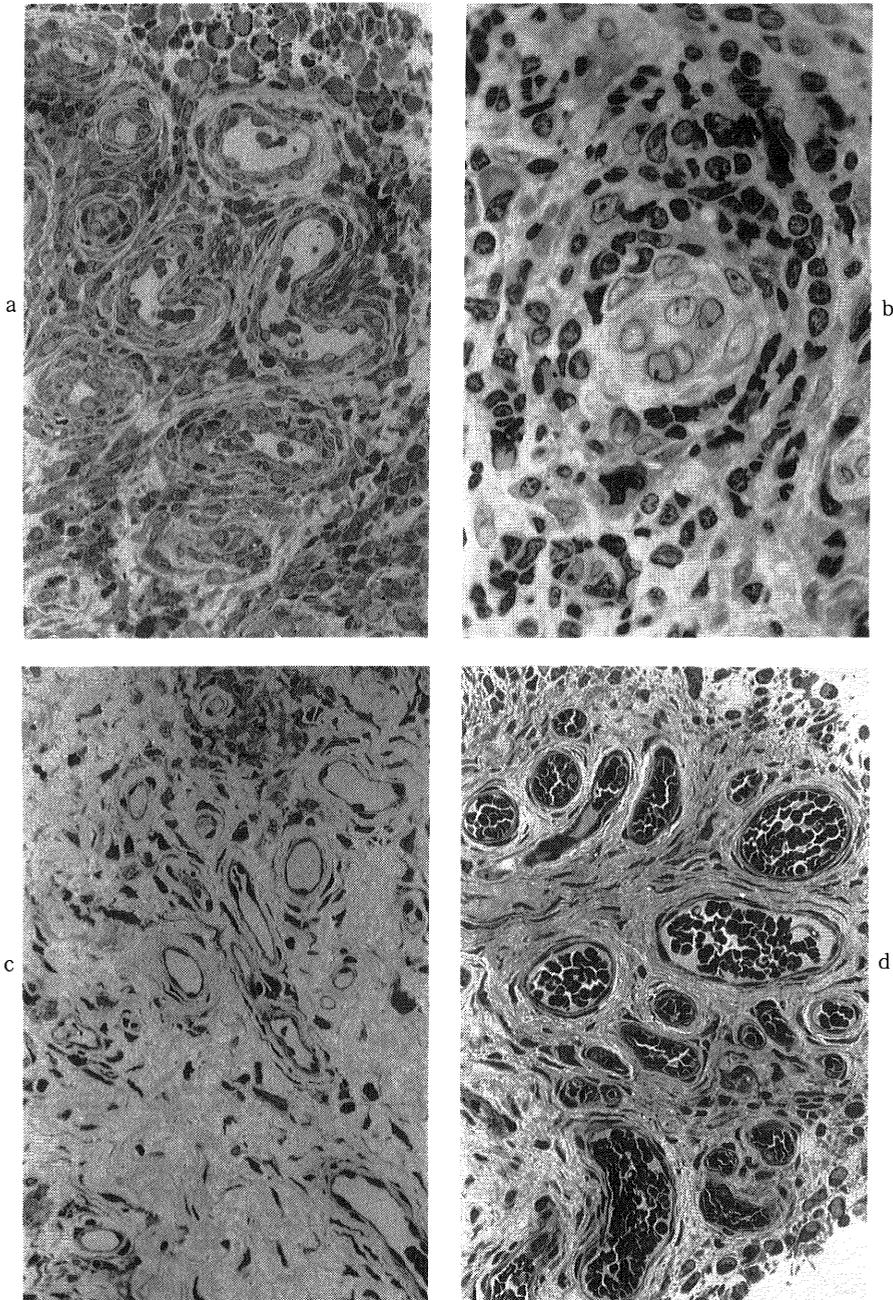


図 5 滑膜血管所見(エボン切片メチレンブルーアズールⅡ染色)

- a; 炎症細胞浸潤部位の血管内皮細胞の腫大した小静脈と毛細血管  
(症例 2,  $\times 400$ ).
- b; リンパ球集簇部の高内皮小静脈様血管(症例 6,  $\times 1000$ ).
- c; 炎症細胞の少ない部位の血管内皮の薄い小静脈と毛細血管(症例 5,  $\times 400$ ).
- d; 変形性膝関節症, 血管増生は見られるが血管内皮は薄い(症例Ⅲ,  $\times 400$ ).

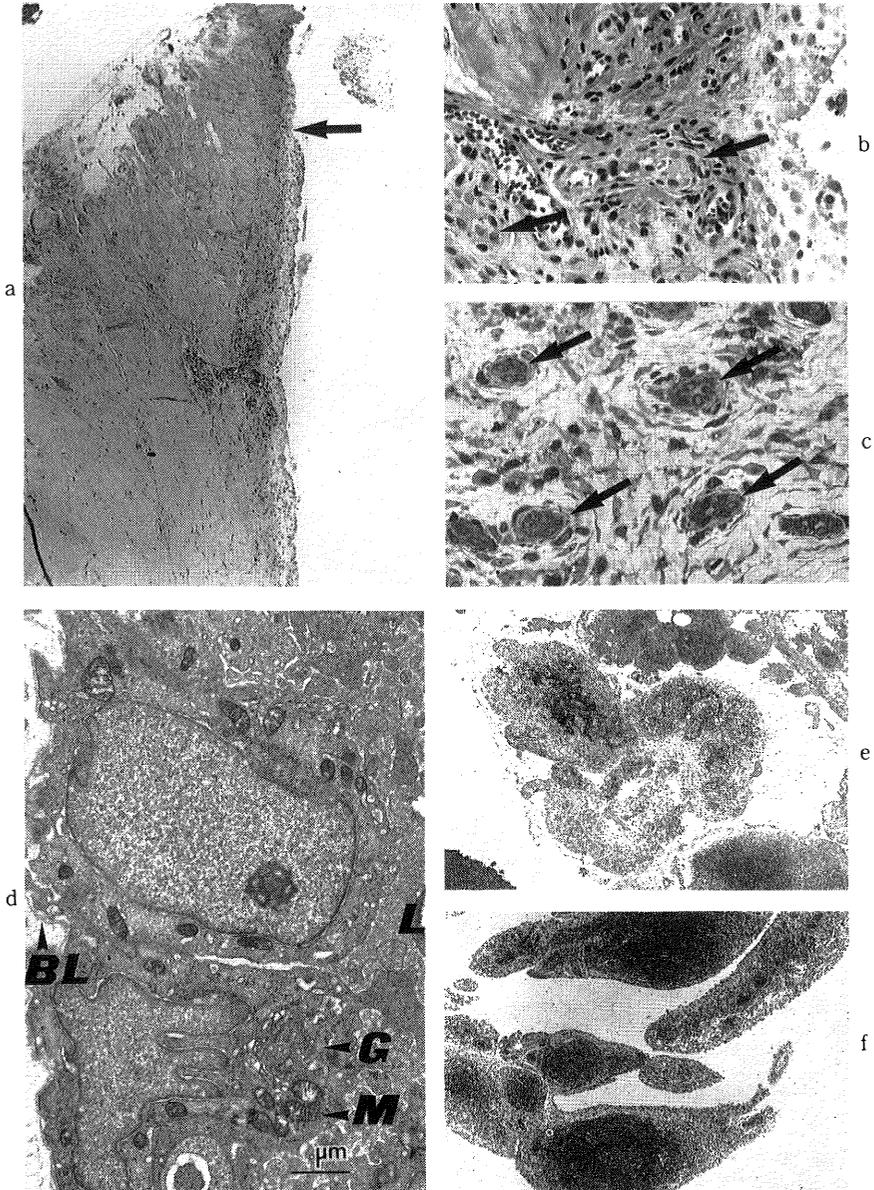


図 6 症例 7 の滑膜組織

- a; 第 1 回生検で、正常の線維組織を貫くような血管新生と滑膜表層細胞直下の局所的浮腫がみられ、写真上部 (矢印) では正常滑膜に移行している。(HE 染色×60)
- b; 新生血管の核は腫大している (矢印)。炎症細胞の浸潤はほとんどない。(HE 染色×300)
- c; 同一生検時のエボン切片では、リンパ球を伴わない高内皮小静脈様血管を認める。(メチレンブルーアズールⅡ染色×1,000)
- d; c の連続切片の血管内皮細胞の電顕像。大きな明るい核、明瞭な核小体、丈の高い胞体および豊富な細胞内小器官がみられ、高内皮小静脈の血管内皮細胞に類似している。  
L; 血管腔 BL; 基底膜 G; ゴルジ装置 M; ミトコンドリア
- e; 第 1 回生検で最も細胞浸潤の強い部位 (×20)。
- f; 第 2 回生検組織像。典型的 RA 滑膜組織像を示している (×20)。

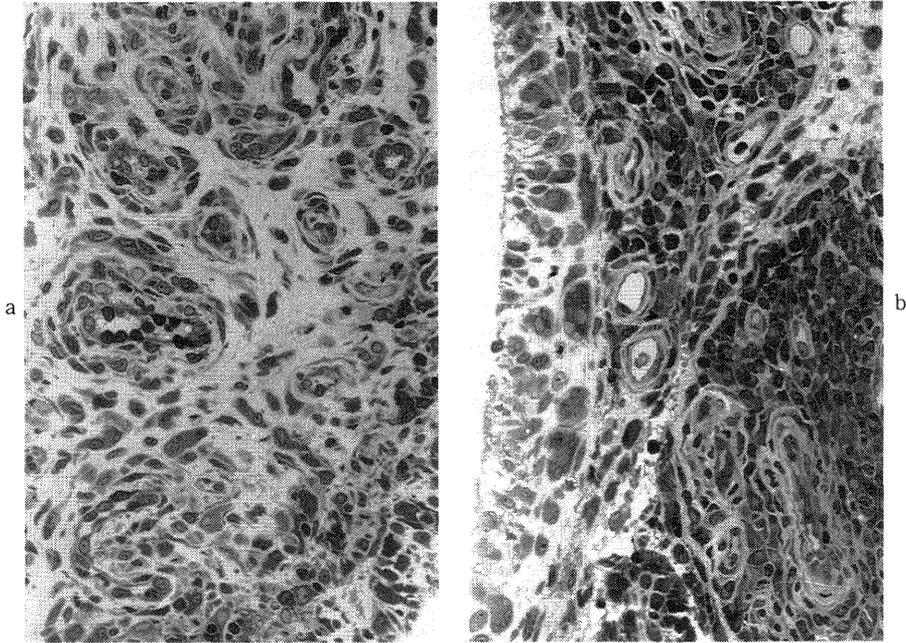


図7 症例9の GST 投与前後の血管変化(エボン切片メチレンブルーアズールII 染色)  
 a; GST 投与前, 血管内皮細胞核の腫大を認めたが周辺には細胞浸潤は少ない.  
 (×400)  
 b; GST 投与後(第3回生検), 血管周囲に細胞浸潤を認めるが血管壁は非薄化している.(×400)

れた(図5b). 一方, 炎症細胞の少ない部位では NIJD 関節滑膜にみられるのと同様の血管内皮細胞の薄い血管がみられる傾向にあった(図5c).

NIJD 関節滑膜では, 絨毛増生, 表層細胞増生, 血管増生, 炎症細胞浸潤がみられた例があったが, いずれも軽度であった. フィブリノイド変性はみられなかった. 血管増生が高度にみられた部位でも血管内皮細胞の腫大はみられなかった(図5d).

次に特徴ある血管所見を呈した2例を供覧する.

症例は76歳女で発症7カ月目 GST を開始した例である. GST 投与前関節滑膜で, 正常の線維組織に割ってはいるように血管増生がみられ, 表層細胞下に浮腫状の変化がみられた(図6a). この部分では炎症細胞の浸潤, 表層細胞の増生はみられず, 血管内皮細胞の核は腫大していた(図6b). 同一生検時のエボン切片でリンパ球浸潤を伴わない高内皮小静脈様の血管を認めた(図6c). 内皮細胞電顕像も, 高内皮小静脈の内皮細胞類似の形態を呈していた(図6d). 同一切片内にリンパ球の散在性浸潤部位がみられ(図6e) さらに第2回目生

検ではリンパ濾胞様構造を伴う典型的な RA 組織像に進行していた(図6f).

症例9は69歳男で発症3カ月目に GST を開始した症例である. GST 投与前関節滑膜では血管内皮細胞が腫大しているが, 周辺には細胞浸潤の少ない小静脈像を認めた(図7a). 第3回目生検では炎症細胞浸潤が血管周囲にみられるのに血管内皮細胞は非薄化していた(図7b).

#### D. 経時生検例の組織炎症所見変化の検討

GST 投与前および後に経時的に関節滑膜を採取できた9例の関節滑膜炎所見の変化を表3に示した. 5項目の評価の総和の投与前と投与後(症例7, 9は第3回生検時)を比較し2ポイント以上の変化を改善および悪化と規定すると改善6例, 悪化2例, 不変1例であった(表3).

#### E. 経時生検例の組織像変化, 臨床所見と金粒子局在の検討

GST 投与前後の Lansbury index を図8に示した. Lansbury index の15%以上の変化を改善, 悪化と規定

表 3 GST 投与前後の組織炎症所見変化

	絨毛増生		血管増生		表層細胞増生		細胞浸潤		フィブリノイド変性		総合評価
	前	後	前	後	前	後	前	後	前	後	
1	2+	+	3+	3+	2+	+	3+	2+	+	-	改善
2	+	+	+	-	2+	+	+	-	-	-	改善
3	+	+	+	2+	+	+	+	+	-	-	不変
4	2+	+	2+	2+	2+	+	2+	+	2+	+	改善
5	3+	+	3+	2+	3+	2+	3+	+	+	+	改善
6	2+	+	2+	2+	2+	+	2+	+	-	-	改善
7	2+	3+	2+	3+	+	3+	+	3+	+	+	悪化
8	+	2+	+	2+	+	2+	+	+	+	+	悪化
9	2+	2+	+	2+	+	2+	+	2+	2+	2+	悪化
		3+		2+		2+		3+		2+	悪化

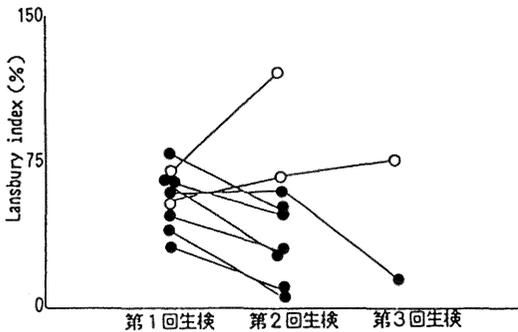


図 8 GST 投与前後における Lansbury index の変化

- 改善例 (15%以上の低下例)
- 悪化例 (15%以上の上昇例)

すると症例1～7の7例に改善, 症例8, 9の2例に悪化がみられた。

光顕組織炎症所見, Lansbury index を指標とする臨床所見の変化と金粒子の関係を表 4 に示した。9例中, ともに改善が6例, ともに悪化が2例計8例に一致が認められた(表 4)。しかし, 1回5mg 投与例の2例は金粒子が検出されず, うち1例は改善, 1例は悪化という結果であった。GST 無効のもう1例は金粒子が検出された例であり, その形態および分布は GST 有効例のそれと大差を認めなかった(図 2, 症例 8)。効果発現と金粒子出現との間には相関はなかった。

#### F. 関節滑膜血管密度

組織の炎症所見が改善しても血管数の変化が少ない印象を持ったので, 関節滑膜表層より 300 $\mu$ 以内の血管密

表 4 金粒子と Lansbury index, 光顕組織炎症所見の変化

		光顕組織炎症所見			
		改善	不変	悪化	合計
Lansbury index	改善	6 (1)	1 (0)		7 (1)
	不変				
	悪化			2 (1)	2 (1)
	合計	6 (1)	1 (0)	2 (1)	9 (2)

( ) 金粒子陰性例

9例中両者ともに改善が6例ともに悪化が2例計8例に両者の一致が認められた。

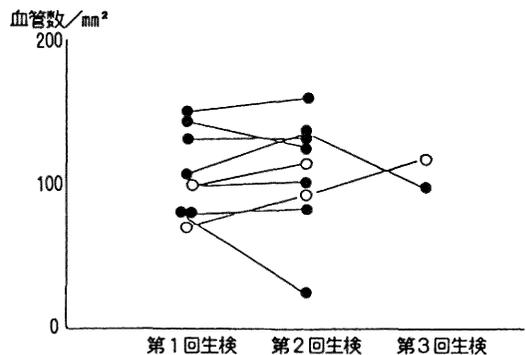


図 9 GST 投与前後における滑膜表層から 300 $\mu$ 以内の血管密度の変化

- ; Lansbury index 改善例
- ; Lansbury index 悪化例

Lansbury index 悪化例では血管密度の増加傾向がみられた。しかし, 改善例で明かな減少を示したものは1例のみであった。

度を計測した。炎症所見悪化の2例では増加傾向を示していた。しかし GST 投与前に比べ投与後明らかな減少を示したのは組織炎症所見改善6例中1例のみであった(図9)。

G. 血管内皮細胞の形態計測

血管内皮細胞の形態計測は経時的関節滑膜採取群のうち良好なエボンブロックが得られた症例2~9および NIJD 群5例について行った。

1. 平均周径

GST 投与後に増加3例, 減少5例で一定の傾向はみられなかった。

2. 平均血管内皮高

8例の個々の標本について GST 投与前後の血管内皮高の変化および有意差検定の結果を表5に示した。Lansbury index が悪化し GST 無効と考えた症例9の第1回と第2回間を除き1%以下の危険率で血管内皮

表5 平均血管内皮高

	第1回生検	第2回生検	第3回生検		NIJD 群
2	1.24 ± 0.53 μ	0.75 ± 0.20 μ*		I	1.25 ± 0.47
3	1.92 ± 0.66	1.05 ± 0.36*		II	0.89 ± 0.25
4	2.51 ± 0.55	1.04 ± 0.47*		III	0.95 ± 0.35
5	2.94 ± 1.20	1.27 ± 0.47*		IV	1.07 ± 0.48
6	1.90 ± 0.76	1.21 ± 0.43*		V	0.70 ± 0.32
7	3.24 ± 1.59	2.20 ± 0.74*	1.03 ± 0.32*		
8	2.57 ± 0.82	1.68 ± 0.79*			
9	2.54 ± 0.70	2.69 ± 0.87	1.56 ± 0.52*		
平均	2.37 ± 0.60	1.49 ± 0.65**	1.29 ± 0.37		0.97 ± 0.42

第1回生検との t 検定, \*: p < 0.01, \*\*: p < 0.05

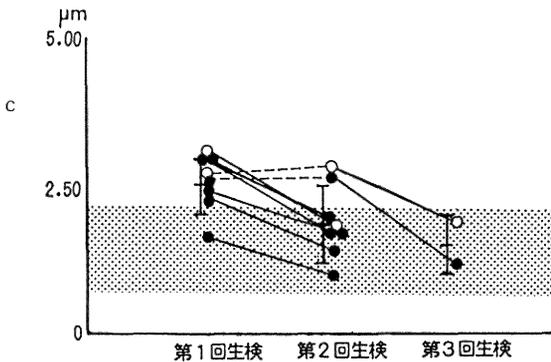
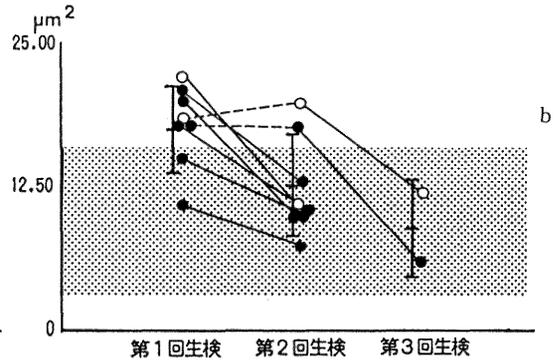
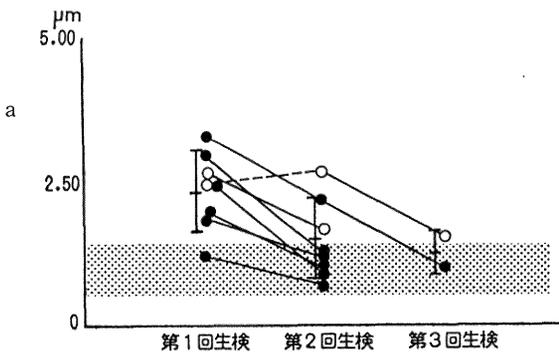


図10 GST 投与前後における血管内皮細胞の形態計測

- a; 平均血管内皮高; 第1回と2回間で1例を除き1%以下の危険率で有意な低下がみられた。
- b; 核断面積; 第1回と2回間で2例を除き1%以下の危険率で有意な低下がみられた。
- c; 平均核幅; 第1回と2回間で2例を除き1%以下の危険率で有意な低下がみられた。各症例の t 検定の結果を示した。

●; Lansbury index 改善例  
 ○; Lansbury index 悪化例  
 実線; p < 0.01 破線; 有意差なし  
 点線; NIJD 群の平均 ± 標準偏差の範囲

高の有意な低下がみられた (表 5)。図 10a に示したように 8 例全体の群間比較では 5% 以下の危険率で低下を示し、このうち Lansbury index 改善例の第 2 回目生検以降の血管内皮高の計測値は NIJD 群の標準偏差の範囲内となっていた (図 10a)。

### 3. 核の断面積および平均核幅

各症例において金投与前後の核の断面積および平均核幅の変化を内皮高と同様に検討し有意差検定を行った結果を図 10b, c に示した。症例 7, 9 の第 1 回と第 2 回間以外はすべて断面積および平均核幅の有意な減少がみられ、8 例全体の群間比較でも GST 投与後 5% 以下の危険率で低下を示し、その計測値は NIJD 群の標準偏差の範囲内となっていた (図 10b, c)。

## IV. 考 察

### A. RA 関節滑膜血管について

リンパ球が生理的に集簇するリンパ節等にみられる高内皮小静脈は血管内からリンパ球が遊走する部位と考えられている<sup>15)16)</sup>。RA 関節滑膜でも高内皮小静脈様血管の分布とリンパ球の集簇部とは一致し、リンパ球の滑膜への流入部位と考えられている<sup>17)18)</sup>。今回検討した RA 罹患関節滑膜の細胞浸潤の強い部位では、高内皮小静脈様血管のほか、腫大した血管内皮細胞が比較的疎に並んだ小静脈や血管内皮細胞が腫大し内腔が小さい毛細血管が数多くみられた。リンパ系の細胞のほかマクロファージや骨髄由来との説が有力な表層 A 細胞、さらに関節液中に多い好中球等種々の炎症細胞もこれらの血管を介して滑膜内に流入する。内皮細胞の腫大した血管では凸凹の増加、内腔の狭小化、流速の低下を生じ、血流中の炎症細胞が血管内皮細胞と接触する機会を物理的に増し、またその腫大は Ia 抗原発現<sup>19)</sup>などの親和性の変化も伴っているとすれば一層炎症細胞の血管外への遊走を容易とすると推察される。これらは RA 炎症の持続にとって重要であると考えられた。

リンパ球が血管内皮細胞に与える影響について多くの報告がみられるが<sup>15)16)19)</sup>、逆にウサギのペルオキスターゼ誘発関節炎<sup>20)</sup>やラットのアレルギー脳脊髄炎<sup>21)</sup>でみられるようにリンパ球集簇前に血管内皮細胞の変化を認めたという報告もある。著者は周囲に炎症細胞がほとんどなく、関節滑膜既存組織が保たれている部位でも高内皮小静脈様血管の増生を認めた (図 6)。このことから滑膜局所で RA 病変が始まる機序の 1 つとして血管内皮細胞の変化が重要であると考えられた。

### B. 金粒子の分布について

GST 関節内注入や 1 回 50mg の大量投与例の RA 罹患関節滑膜の金粒子は、表層 A 細胞で初めて確認され<sup>9)</sup>、その後これに加え関節滑膜下マクロファージ<sup>10)11)12)</sup><sup>13)</sup>、線維芽細胞<sup>10)13)</sup>でも確認されるようになったが、これらいずれの報告も主要な沈着は表層細胞に見られるとしている。一方、Vernon-Roberts ら<sup>12)</sup>は、GST 大量投与中の症例において金粒子は表層細胞に多くみられるが、投与中止後 2~23 年経過した症例では表層細胞にはみられなくなり関節滑膜下層のマクロファージに見られるとしている。本研究の対象は全例 GST 少量投与中であるが、金粒子は主に関節滑膜下層のマクロファージのライソゾーム内にみられ、大量投与後の中止例と類似した分布を示していた。大量投与例の血清金濃度は 300  $\mu\text{g}/\text{dl}$  以上に達し本研究の対象例に比べて著しく高いが投与中止後は徐々に低下してくる。以上の事実から血清金濃度が低い場合には関節滑膜下層のマクロファージに局在する率が高くなると考えられた。

一方、金粒子が見つからなかったのは、総投与量の少ないものおよび 1 回投与量が少ない例で、投与量の増加とともに金粒子の出現頻度は増加する傾向にあった。経時生検例の臨床所見と組織像変化とは一致傾向を認めたが、金粒子の局在および形態とは一致しなかった。

関節滑膜金濃度は、血中濃度より高いと報告されている<sup>22)23)</sup>が、EPMA では金粒子が存在している部位すなわちマクロファージと表層細胞以外では Au は検出されなかった。この高値は主にこれらのライソゾームの金粒子によるものであって、それ以外の部位はおそらく血中濃度と同程度に低いと推察された。以上の事から GST は金粒子としてではなく溶解した状態で効果発現する可能性が示唆された。

### C. GST の作用機序

GST の作用機序の説明としてコラーゲンの cross-linkage の形成促進<sup>1)</sup>、ライソゾーム酵素抑制<sup>2)</sup>、補体活性化抑制<sup>3)</sup>、プロスタグランジンの合成抑制<sup>4)</sup>、食細胞の貪食抑制<sup>5)</sup>、リンパ球の芽球化抑制<sup>6)</sup>等諸説が提唱されている。しかしこれらの根拠となる実験の多くは、少量投与では決して達し得ず大量投与で達し得る血清 GST 濃度よりも高い濃度で行われたものである。一方、Matsubara らは血管内皮細胞を培養し <sup>3</sup>H-サイミジンの取り込み実験で、比較的低い GST 濃度 (100  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ) でこれらの細胞増殖は抑制されたことから、血管新生抑制を作用機序と考え、GST の遅効性をも説明できると報告した<sup>7)</sup>。自験例の血清金濃度は多くの例で 100  $\mu\text{g}/$

dl より低値を示していたが、これは最も低値となるときの値であり、投与後早期には 100 $\mu$ g/dl 程度の血中濃度は保たれていたと推察され、GST の作用機序として有力と考えた。

GST が血管新生を抑制している可能性の考察の当否について検討するため、GST 投与前後で関節滑膜表層の血管密度の変化を検討した。GST 投与前に比べ投与後血管密度の明らかな減少を示したのは組織像が改善した6例中1例のみであった。しかし、GST 投与後の関節滑膜では血管内皮細胞が薄くなっているのを認めた。そこで、血管内皮細胞の形態計測を行ったところ、GST 投与後の血管内皮細胞は、血管周囲の細胞浸潤が増加している例も含めて全例で、高さの減少、核の縮小、偏平化がみられた。すなわち、GST による関節滑膜血管の変化は数の変化ではなく血管内皮細胞の形態すなわち質の変化である事を確認できた。

今回の検討のみからでは、血管内皮細胞の偏平化は、GST による直接作用によるものか、あるいは金粒子が認められたマクロファージ系の細胞に作用して血管内皮細胞を活性化させるインターロイキン-1や血管内皮細胞増殖因子<sup>24)</sup>などの化学伝達物質を抑制することによる間接作用かは特定できなかった。しかし、血管内皮細胞がほかの細胞より低濃度の GST により影響を受けることおよび著者の検討の結果から、GST は腫大した血管内皮細胞に作用してこれを偏平化し、正常形態に近づけ、炎症細胞の滑膜内流入を減少させることにより滑膜炎を抑制すると推察された。

## V. ま と め

1回投与量 10mg 以下の5-10mg 投与群23例、経過中または生検時に1回 20mg ないし 25mg 投与を受けていた20-25mg 投与群8例の2群について GST 初回投与後の RA 滑膜における金粒子の局在、形態の検討を electron probe microanalyzer および電顕を用いて行った。また GST 投与前および投与後、経時的に滑膜採取できた9例で Lansbury index を指標とする臨床所見、滑膜組織像および金粒子の局在の相互関係について検討した。さらに滑膜表層血管密度の計測と非炎症性関節疾患5例を対照とした血管内皮細胞の画像解析装置を用いた形態計測を行い、GST 投与前後の RA 罹患関節滑膜内の血管変化を検討した。

1. 金粒子は、5-10mg 投与群のみならず20-25mg 投与群も含め、少量投与群全例においても、おもに関節滑膜下層のマクロファージに認められ、表層細胞に多い

とされる大量例の報告とは異なっていた。しかし、金粒子の集合体の形態については本質的な差はなかった。

2. 金粒子の局在と治療効果との相関はみられなかったが、Lansbury index と組織像の改善、悪化は9例中8例で一致がみられた。

3. GST 投与後の関節滑膜表層の血管密度は組織像が悪化した2例では増加傾向を示したが、改善した6例中減少を認めたのは1例のみであった。

4. GST 投与前の血管内皮細胞は腫大していたが、投与後は全例で、高さの減少、核の縮小および核の偏平化がみられた。

5. RA 罹患関節滑膜の血管内皮細胞の腫大した血管は細胞浸潤部位にみられ、炎症の持続にとって重要な要因となっていると考えられる。GST の作用機序として培養実験からは血管新生の抑制が強調されているが、著者の RA 患者滑膜の検討結果から、GST が腫大した血管内皮細胞に作用してこれを偏平化し、正常形態に近づけ、炎症細胞の滑膜内流入を減少させることにより滑膜炎を抑制すると推察された。

稿を終えるにあたり、終始御指導をいただいた恩師田島達也教授に深厚の謝意を表します。ご指導をいただいた第一口腔解剖小澤英浩教授、江尻貞一助教授、病理部江村巖助教授に心からお礼申し上げます。また研究にご協力いただいた羽生忠正博士ならびにリウマチ研究班各位、錦織新一、赤沢秀喜、斉藤昌文技官ならびに教室諸兄、XMA 室小林正義技官に厚くお礼申し上げます。

なお本論文の要旨は第3回日本整形外科学会基礎学術集會に発表した。

## 参 考 文 献

- 1) Adam, M., Fietzek, P. and Kuehn, K.: Investigations on the reaction of metals with collagen in vivo. 2 The formation of cross-links in the collagen of lathyrictic rats after gold treatment in vivo. *Eur. J. Biochem.*, **3**: 411~414, 1968.
- 2) Persellin, R.H. and Ziff, M.: The effect of gold salt on lysosomal enzymes of the peritoneal macrophage. *Arthritis Rheum.*, **9**: 57~65, 1966.
- 3) Schultz, D.R., Volanakis, J.E., Arnold, P.I., Gottlieb, N.L., Sakai, K. and Stroud, R.M.: Inactivation of C1 in rheumatoid synovial fluid,

- purified C1 and C1 esterase by gold compounds. Clin. Exp. Immunol., 17: 395~406, 1974.
- 4) Stone, K.J., Mather, S.J. and Gibson, P.P.: Selective inhibition of prostaglandin biosynthesis by gold salts and phenylbutazone. Prostaglandins., 10: 241~251, 1975.
  - 5) Davis, P., Miller, C.L. and Russell, A.S.: Effect of gold compounds on the function of phagocytic cells. J. Rheum. Suppl., 8: 18~24, 1982.
  - 6) 浜井貴人, 根岸雅夫, 高橋昭三: 遅効性抗リウマチ剤の正常人リンパ球芽球化現象に及ぼす影響に関する研究. リウマチ, 23: 193~201, 1983.
  - 7) Matsubara, T. and Ziff, M.: Inhibition of human endothelial cell proliferation by gold compounds. J. Clin. Invest., 79: 1440~1446, 1987.
  - 8) 内田詔爾, 佐藤 茂, 森重登志雄, 中村信也, 川村晴也: Auranofin, GST, D-ペシニラミンの慢性関節リウマチに対する有用性の検討. 日関外誌, 2: 399~412, 1983.
  - 9) Norton, W.L. and Ziff, M.: Electron microscopic observation on the rheumatoid synovial membrane. Arthritis Rheum., 9: 589~610, 1966.
  - 10) 邱 松壽: 金塩の細胞内局在について光顕並びに電顕的研究. リウマチ, 15: 54~73, 1975.
  - 11) Ghadially, F.N., Orsychak, A.F. and Mitchell, D.M.: Ultrastructural changes produced in rheumatoid synovial membrane by chrysotherapy. Ann. Rheum. Dis., 35: 67~72, 1976.
  - 12) Vernon-Roberts, B., Dore, J.L., Jessop, J.D. and Henderson, W.J.: Selective concentration and localization of gold in macrophages of synovial and other tissues during and after chrysotherapy in rheumatoid patients. Ann. Rheum. Dis., 35: 477~486, 1976.
  - 13) 西林保朗: 慢性関節リウマチ滑膜における免疫グロブリンおよび金塩の局在. リウマチ, 19: 454~472, 1979.
  - 14) Walter, M.T., Smith, J.L., Moore, K., Evans, P.R. and Cawley, M.I.D.: An investigation of the action of disease modifying antirheumatic drugs on the rheumatoid synovial membrane: reduction in T lymphocyte subpopulations and HLA-DP and DQ antigen expression after gold or penicillamine therapy. Ann. Rheum. Dis., 46: 7~16, 1987.
  - 15) Parrott, D.M.V., de Sousa, M.A.B. and East, J.: Thymus-dependent areas in the lymphoid organs of neonatally thymectomized mice. J. Exp. Med., 123: 191~203, 1966.
  - 16) Goldschneider, I. and McGregor, D.D.: Migration of lymphocytes and thymocytes in the rat. I. The route of migration from blood to spleen and lymph nodes. J. Exp. Med., 127: 155~168, 1968.
  - 17) Iguti, T. and Ziff, M.: Electron microscopic study of rheumatoid synovial vasculature. J. Clin. Invest., 77: 355~361, 1986.
  - 18) Freemont, A.J., Jones, C.J.P., Bromley, M. and Andrews, P.: Changes in vascular endothelium related to lymphocyte collection in diseased synovia. Arthritis Rheum., 26: 1427~1433, 1983.
  - 19) Pober, J.S., Gimbrone, M.A. Jr., Cotran, R.S., Reiss, C.S., Burakoff, S.J., Fiers, W. and Ault, K.A.: Ia expression by vascular endothelium is inducible by activated T cells and by human interferon. J. Exp. Med., 157: 1339~1353, 1983.
  - 20) Graham, R.C. and Shannon, S.L.: Peroxidase arthritis. II. Lymphoid cell-endothelial interactions during a developing immunologic inflammatory response. Am. J. Pathol., 69: 7~24, 1972.
  - 21) Sobel, R.A., Blanchette, B.W., Bhan, A.K. and Colvin, R.B.: The immunopathology of experimental allergic encephalomyelitis. J. Immunol., 132: 2393~2407, 1984.
  - 22) Gottlib, N.L., Smith, P.M. and Smith, E.M.: Tissue gold concentration in a rheumatoid arthritis receiving chrysotherapy. Arthritis Rheum., 15: 16~22, 1972.
  - 23) Grahame, R., Billings, R., Laurence, M., Marks, V. and Wood, P.J.: Tissue gold levels after chrysotherapy. Ann. Rheum. Dis., 33: 536~539, 1974.
  - 24) 岡部哲郎: 血小板およびマクロファージ由来の血管内皮細胞成長因子, 月刊組織培養, 11: 512~518, 1985.

(平成元年2月22日受付)