

関節リウマチモデルに対する etidronate disodium の治療効果 —— MRL/Mp-*lpr/lpr* マウスならびに コラーゲン関節炎ラットを用いた初期病変の検討 ——

林 大

東京慈恵会医科大学整形外科科学講座

(受付 平成 16 年 8 月 9 日)

THERAPEUTIC EFFECTS OF ETIDRONATE DISODIUM IN ANIMAL MODELS OF RHEUMATOID ARTHRITIS —— INVESTIGATION OF EARLY CHANGES IN MRL/Mp-*lpr/lpr* MICE AND RATS WITH COLLAGEN-INDUCED ARTHRITIS ——

Hiroshi HAYASHI

Department of Orthopaedic Surgery, The Jikei University School of Medicine

Etidronate disodium (EHDP) is a drug used to suppress osteoclastic activity. The therapeutic effects of EHDP on autoimmunity to type II collagen and histopathologic changes were examined in the early phase of rheumatoid arthritis (RA) in MRL/Mp-*lpr/lpr* (MRL/*l*) mice and collagen-induced arthritis (CIA) in rats.

Rats with CIA and 1-week-old MRL/*l* mice received subcutaneous injections EHDP (10 or 20 mg/kg) daily for 4 weeks. The volume of the hind paw swelling was measured as an index of inflammation. Levels of anti-type II collagen antibodies in sera were quantified with enzyme-linked immunosorbent assay. Histochemical changes in the knee were examined after hematoxylin and eosin staining, tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining and immunohistochemical staining with antibodies against calcitonin receptor, CD68 and c-Fos.

The untreated control animals exhibited the increase in anti-type II collagen antibody levels before the onset of synovitis and showed accumulation of TRAP positive multinucleated cells and immature mesenchymal cells in the subchondral bone area of the knee. Treatment with EHDP decreased paw swelling, numbers of TRAP-positive cells, and levels of anti-type II collagen antibodies.

These results suggest that early administration of EHDP prevents the development and progression of RA by suppressing destruction of bone and cartilage in subchondral bone area.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2004; 119: 429-39)

Key words: rheumatoid arthritis, MRL/Mp-*lpr/lpr* (MRL/*l*) mice, collagen-induced arthritis (CIA) rat, etidronate disodium, anti-type II collagen antibody

I. 緒 言

関節リウマチ (rheumatoid arthritis; RA) は、原因不明の慢性炎症性疾患であるが、その発症と進展には、免疫学的異常と関節構成体に過剰産生

される組織傷害性因子が関与していると考えられている。

RA における関節軟骨の変性と破壊において重要な役割を演ずるのは、関節滑膜、軟骨細胞および軟骨下骨髄組織である。これまでの多くの研究

はその主たるものとして滑膜の重要性を強調するものであった。一方、東京慈恵会医科大学整形外科科学講座ではこれまでに、RA患者の血清中には関節軟骨で合成されるII型コラーゲンに特異的なIgGクラスの抗コラーゲン抗体が産生されること¹⁾⁻⁵⁾、RAの関節軟骨では変形性関節症(osteoarthritis; OA)と異なり、その深層から破壊が生じてくること、関節軟骨深層に接する軟骨下骨髄には多核大型細胞、マクロファージ、免疫担当細胞などのほか protooncogene の1つである *c-fos* を発現している細胞が集積してくること、さらに、その中の一部は、酒石酸耐性酸フォスファターゼ (tartrate resistant acid phosphatase; TRAP) 陽性を示す破骨細胞様細胞であることなどを見出している⁶⁾⁻⁸⁾。

これらの事実は、RAの骨関節破壊が、滑膜組織にのみ依存するものではなく、その発症と進展には、軟骨細胞や軟骨マトリックスに生じる変化、さらにはこれらの変化と軟骨下の骨髄組織にみられる TRAP 陽性細胞などの細胞間での interaction がきわめて重要であることを示唆するものと考えられる。

こうした観点から、著者は、関節破壊の初期の軟骨下骨での多核大型細胞の集積を抑えることが、RAの関節破壊の発症と進展の抑制につながる可能性があるものと考えた。そこで、本研究では、RAにきわめて類似した関節炎を発症するコラーゲン誘導関節炎(collagen-induced arthritis; CIA)ラット、および関節炎、腎炎、血管炎などを自然発症する MRL/Mp-*lpr/lpr* (MRL/l) マウスをRAの病態モデルとして選択し、これに、破骨細胞活性を抑制する作用を有する etidronate disodium (EHDP) を投与して、関節炎発症初期の病変に対する効果について検討した。

II. 対象および方法

1. 実験動物

1) MRL/l マウス

MRL/l マウス(日本チャールズ・リバー社、横浜)は生後3日齢のものに、1週齢より薬剤投与を開始した。生後2, 3, 4, 6, 10, 15週の時点でエーテル麻酔下に心房採血を施行し、脱血の後屠殺、両膝関節組織を採取した。また、多臓器病変の出現

の有無を確認するため、腎臓、脾臓も摘出した。

2) CIA ラット

体重170g前後のLewis系雌ラット(日本チャールズ・リバー社、横浜)を用い、CIAを作製した。CIAは、ラットの臀部皮内に、ウシ関節軟骨から精製したII型コラーゲン1.0mgを、Freundの不完全アジュバント(ナカライテスク社、京都)ならびにMDP(N-acetyl-muramyl dipeptide, 第一製薬、東京)とともに感作することにより作製した⁹⁾¹⁰⁾。感作後1週、10日、2, 3, 4, 5週の時点で、エーテル麻酔下に尾静脈より採血するとともに、一部はエーテルにて屠殺し、膝関節組織を採取した。

2. 薬剤の投与

MRL/l マウス60匹およびCIAラット30匹を、それぞれ対照群ならびに薬剤投与の2群に分けた。薬剤投与群はさらに2群に分け(計3群、各群MRL/l マウスは20匹、CIAラットは10匹ずつ)それぞれにEHDP(住友製薬、大阪)10, 20mg/kgを、対照群には溶解液であるphosphate buffered saline (PBS, pH 7.2)を、MRL/l マウスでは生後1週齢から5週齢まで、CIAラットでは感作直後より4週間連日皮下投与した。

3. 関節炎の評価

関節炎の発症の有無とその推移は、足容積測定装置(室町機械、東京: Volume Meter MK-550)を用いてラット両側後肢の足部容積(paw volume)を、採血日ごとに測定し評価した。なお、容積の増加率は、感作日の平均paw volume (paw volume 0)に対する両側後肢の平均増加量を算出し、paw volume 0あたりの百分率として表示した。

4. 血清抗体値の測定

血清抗II型コラーゲン抗体は、Fujiiら¹⁾が開発したenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法に準じてIgGおよびIgMクラスのものを用いて測定した。なお、検体量の関係からMRL/l マウスではIgGクラスのものみの測定とした。リン酸緩衝液(pH 7.6)にて5μg/mlに溶解したウシII型コラーゲン溶液を、96 wellのELISAプレート(Coster社、Cambridge, USA)の各wellに100μlずつ添加し4°Cで一晩コーティングした後、非特異的タンパク吸着阻止のため100%正

常ウサギ血清 (normal rabbit serum; NRS) を 100 μ l ずつ添加し, 室温で 30 分間反応させた. プレート洗浄後, NRS にて希釈した被検血清 100 μ l を各 well に添加し 30°C で 2 時間反応させた. なお, IgG クラスの抗体測定には 1,000 倍, IgM クラスの抗体測定には 50 倍の血清希釈を行った. その後, 25%NRS-リン酸緩衝液にて 2 μ g/ml に希釈したペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ラット IgG および IgM 抗体, または抗マウス IgG 抗体 (Cappel 社, Cochranville, PA) 100 μ l を分注して 30°C, 2 時間反応させた. O-phenylenediamine と H₂O₂ にて 30 分反応させ, H₂SO₄ を加えて反応を終了させた. 吸光度は, マイクロプレートフォトメーター (Type MTP-22, Corona Electric 社, 茨城) を用いて 492 nm で測定し, 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blankとして減じた. さらに, 抗体値は, Terato らの方法¹¹⁾ 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て算出した.

5. 組織の固定・脱灰

採取した膝関節組織は, 直ちに矢状面で半割し,

従来より著者らが行っている方法にて固定, 脱灰処理を行った. すなわち, periodate-lysine-parafomaldehyde (PLP) 溶液にて 4°C で 6 時間以上固定後, 冷アルコールで脱脂し, 15% glycerol 加 EDTA 溶液にて -4°C で十分に脱灰した. アルコールで段階的に脱水した後, パラフィンに包埋した. パラフィンブロックを 2.5 μ m に薄切し, poly-L-lysine でコーティングされたスライドグラスに切片を作成した.

6. 組織学的観察

切片にヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を施行し, 滑膜, および骨・軟骨組織の炎症に伴う変化について病理組織学的に検討した. ついで, 破骨細胞を同定するために, 組織切片に TRAP 染色を施行した¹²⁾¹³⁾.

7. 免疫組織化学的方法

破骨細胞の細胞表面マーカーであるカルシトニンレセプター (calcitonin receptor; CTR) に対する抗体 (goat affinity-purified polyclonal anti-human Calcitonin(G-18), Santa Cruz Biotechnol. Inc. California, USA) を, マクロファージ系細胞の細胞表面マーカーである CD68 に対す

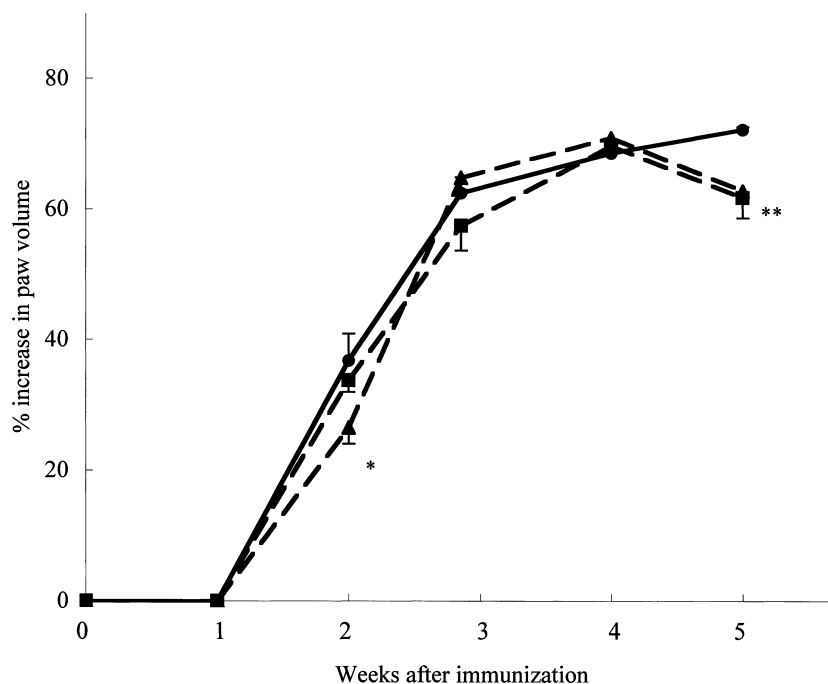


Fig. 1. Effects of etidronate disodium (EHDP) on hind paw swelling in rats with type II collagen-induced arthritis (CIA). (Student's *t*-test, **p*<0.05, ***p*<0.01). Bars show the mean±SE. ● control; ■ EHDP 10 mg/kg; ▲ EHDP 20 mg/kg.

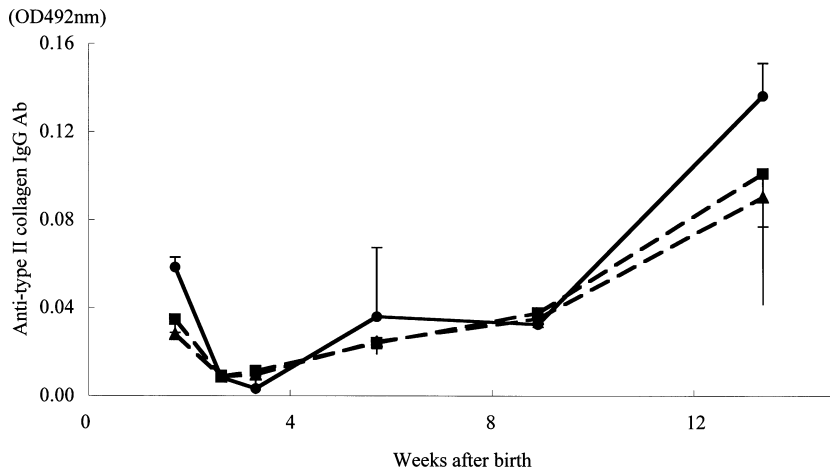


Fig. 2. Effects of EHDP on anti-type II collagen antibody production in MRL/Mp-*lpr/lpr* (MRL/l) mice. Bars show the mean \pm SE. ● control; ■ EHDP 10 mg/kg; ▲ EHDP 20 mg/kg.

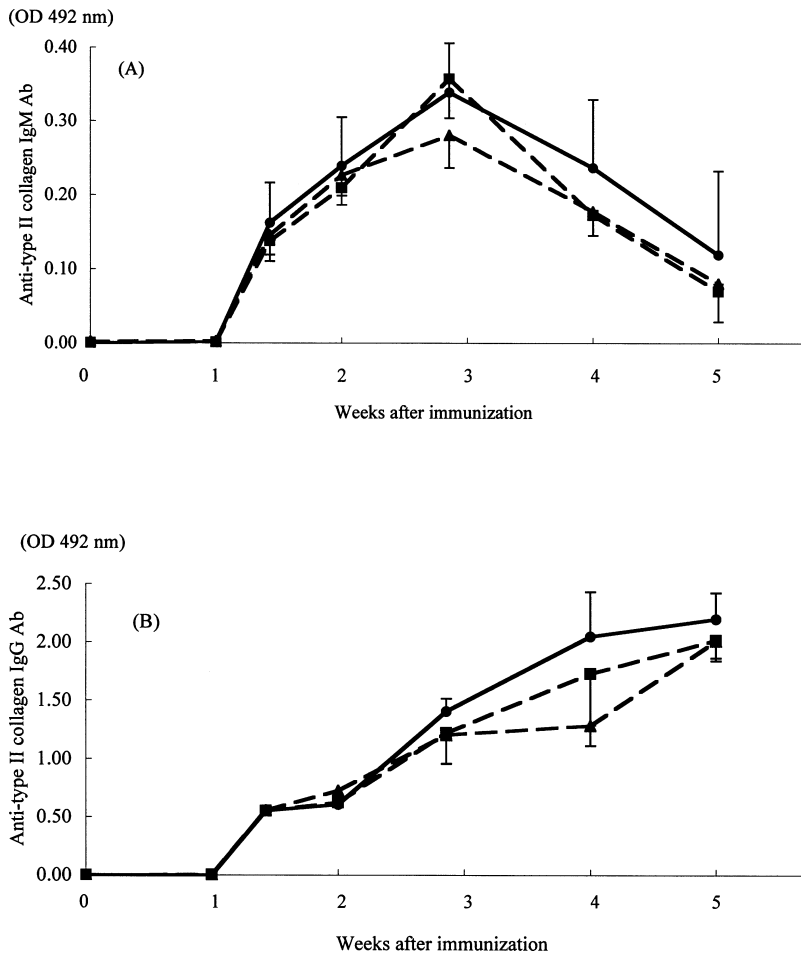


Fig. 3. Effects of EHDP on anti-type II collagen antibody production in collagen-induced arthritis (CIA) rats. The level of IgM antibody (A) and IgG antibody (B). Bars show the mean \pm SE. ● control; ■ EHDP 10 mg/kg; ▲ EHDP 20 mg/kg.

る抗体 (goat affinity-purified polyclonal anti-mouse CD68 (M-20), Santa Cruz Biotechnol. Inc. California, USA) を、また、*c-fos* の発現を同定するため、抗 *c-Fos* 抗体 (goat affinity-purified polyclonal anti-human *c-Fos* p62, *c-Fos* (4)-G: sc-50-G, Santa Cruz Biotechnol. Inc. California, USA) をそれぞれ一次抗体として用いて、VECTASTAIN ABC kit (フナコシ, 東京) による免疫組織化学染色を施行した。

なお、以上の操作はすべて東京慈恵会医科大学動物実験指針に準拠して行った。

III. 結 果

1. ラット後肢足部の容積増加率

CIA 対照群の paw volume は、感作後 10 日前後から徐々に増加し、感作後 4 週が経過する頃には、その全例の後肢足部に肉眼的に明らかな関節炎の発症を認めた。薬剤投与群についてみると、対照群に比べ関節炎の発症が遅延する傾向が観察され、EHDP 20 mg/kg 投与群では、感作後 2 週の paw volume の増加率が対照群に比べ有意に低値を示した。さらに、EHDP 10 mg ならびに 20 mg/kg 投与群のいずれにおいても、感作後 4 週以降 paw volume の増加率は減少する傾向を示し、感作後 5 週には有意な減少を認めた (Fig. 1)。

一方、MRL/l マウスでは、全観察期間中に足趾

の腫脹は認めなかった。

2. 血清抗 II 型コラーゲン抗体

1) MRL/l マウス

血清中の抗 II 型コラーゲン抗体値は、これまでの著者らの知見と同様に、全ての群において、生後 4~5 週頃より上昇を始め、15 週齢すぎまで上昇を続けた。EHDP 投与群では、対照群と比較して有意な差は認めないものの、生後 80 日以後低値を示す傾向が観察された (Fig. 2)。

2) CIA ラット

対照群では、関節炎の発症に先立って、血清抗 II 型コラーゲン抗体が上昇した。すなわち、IgG クラスの抗体は感作後 10 日目頃から徐々に増加し、5 週に至るまで継続して高値を示した。また、IgM クラスの抗体は、速やかに増加して感作後 3 週にはピークに達し、以降消退した。一方、薬剤投与群についてしてみると、IgG クラスの抗体は感作後 3 週から 5 週にいたるまで各群間に有意な差は認めないものの、対照群に比べ低値を示す傾向が観察された。また、IgM クラスの抗体も、EHDP 20 mg/kg 投与群では感作後 2 週から 5 週にいたるまで、EHDP 10 mg/kg 投与群では感作後 3 週から 5 週にいたるまで各群間に有意な差は認めないものの、対照群に比べ低値を示す傾向が観察された (Fig. 3A, B)。

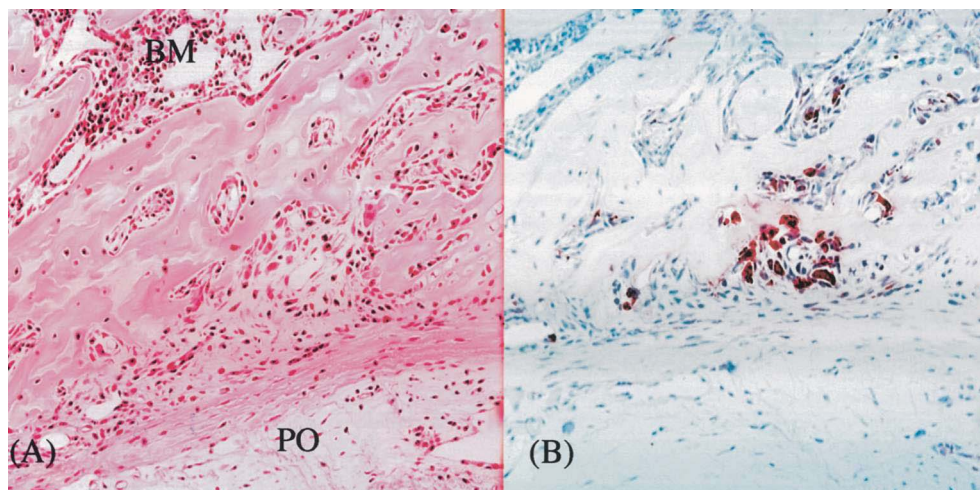


Fig. 4. Histopathological preparations of a sagittal-sectioned knee joint of MRL/l mice at 4 weeks after birth. (A) Hematoxylin and eosin (HE) staining, $\times 200$: The periphysis is shown as a fibrochondroosseous area surrounded by periosteum (PO), bone marrow (BM), growth plate and subchondral bone. (B) TRAP staining, $\times 200$.

3. 病理組織像

1) MRL/l マウス

膝関節の組織像についてみると、いずれのマウスにおいても滑膜の炎症所見は極めて軽度であり、生後15週齢までに滑膜の増殖を伴う明らかな関節炎の所見は認めなかった。しかし、対照群では4週齢より、軟骨下骨-成長軟骨、骨膜、骨髄にはさまれた線維性の骨・軟骨で Oestreich らにより命名された periphysis¹⁴⁾ に相当する部分に、血管増生を伴って、未分化間葉系細胞様の紡錘形の細胞、多核の大型細胞が集積しており (Fig. 4A)、これらの細胞の一部は TRAP 染色で陽性を示していた (Fig. 4B)。こうした periphysis に集積する細胞のうち、面積 $0.5 \mu\text{m}^2$ 以上で TRAP 染色陽性の大型細胞数は、4~6週齢にかけて増加する傾向

が観察された (Fig. 5)。

一方、EHDP 投与群でも4週齢より、同様な組織学的な変化が観察されたが、対照群に比べて、TRAP 陽性細胞の集積は軽度であった (Fig. 6A, B)。そこで、単位面積 0.2mm^2 当たりの、面積 $0.5 \mu\text{m}^2$ 以上の TRAP 陽性細胞数をカウントしてみると、EHDP 投与群では、各週齢において対照群に比べて、その数が有意に減少していた (Fig. 7)。

なお、全観察期間中に腎炎、脾腫を示す所見は認められなかった。

2) CIA ラット

感作後2週における対照群の膝関節組織像をみると、いまだ滑膜の増殖性変化は認められなかったが、関節軟骨下骨に島状に大型の細胞の集積が観察された (Fig. 8A)。この大型細胞には多核のもの

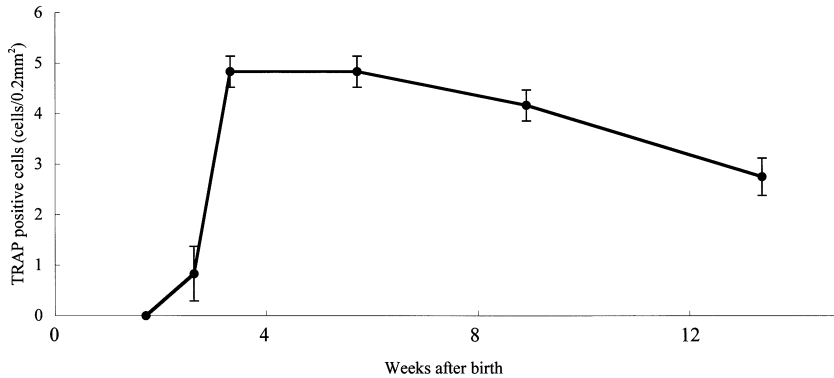


Fig. 5. Change in the number of TRAP positive cells in the periphysis of MRL/l mice. Bars show the mean \pm SE.

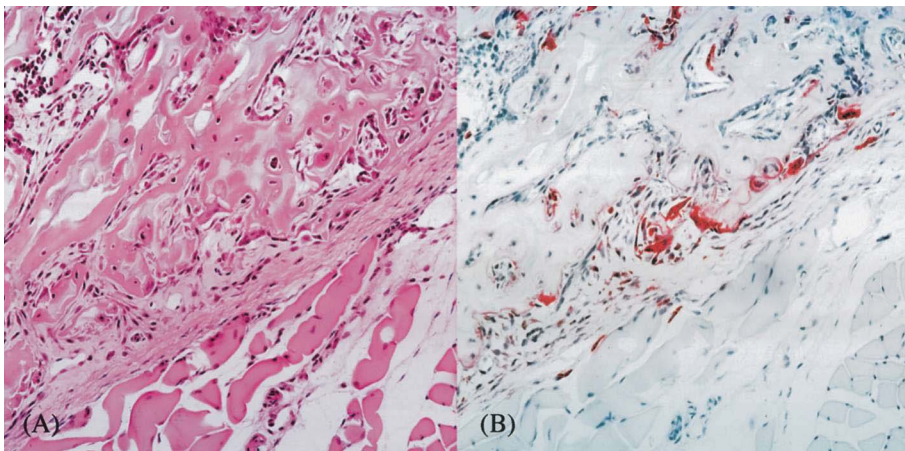


Fig. 6. Effects of EHDP on histopathology of the knee joint of MRL/l mice. (A) HE staining, $\times 200$; (B) TRAP staining, $\times 200$.

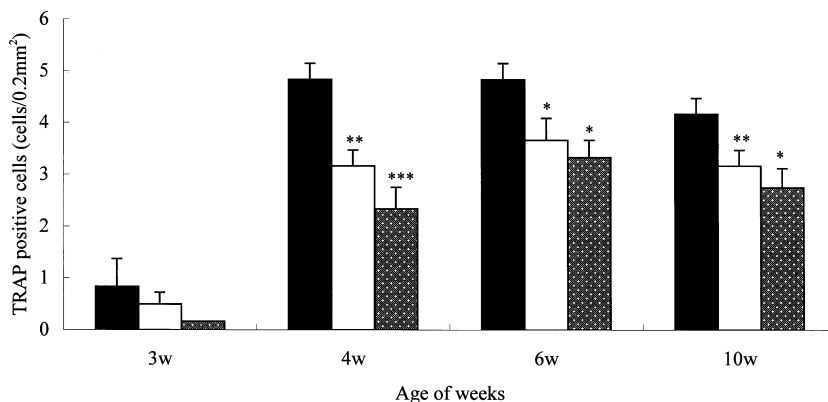


Fig. 7. Effects of EHDP on the number of TRAP positive cells in the periphysis of MRL/l mice (Student's *t*-test, **p*<0.05; ***p*<0.01; ****p*<0.005). Each value is the mean±SE. black bars; control, white bars; EHDP 10 mg/kg, gray bars; EHDP 20 mg/kg.

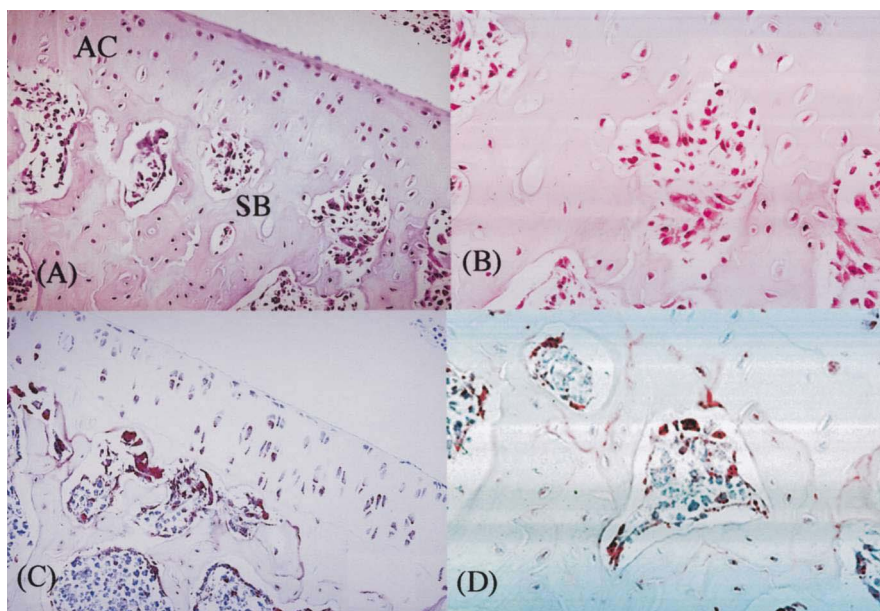


Fig. 8. Histopathological preparations of a knee joint of the CIA rats at 2 weeks after immunization. In HE staining preparation, the knee joint of the CIA rats didn't demonstrate profound proliferation of synovial lining cells yet, but there is considerable formation of islands that invaded the deep zone of the articular cartilage (AC) through the calcified cartilage from the subchondral bone (SB) (A, ×200; B, ×400). In TRAP staining, multinucleated giant cells and part of mononucleated cells are positive. (C, ×200; D, ×400).

のと単核のものがあ、破骨細胞および間葉系細胞に類似した細胞像を呈していた (Fig. 8B)。また、これらの細胞は、TRAP 染色で陽性を呈した (Fig. 8C, D)。一方、薬剤投与群についてみると、軟骨下骨に集積する大型細胞ならびに TRAP 染色で陽性を示す細胞の数の減少が観察された

(Fig. 9A, B)。

4. 免疫組織化学染色

MRL/l マウスの対照群では、軟骨下骨に集積する TRAP 陽性の多核大型細胞の一部に CTR 陽性を示す細胞を認めた (Fig. 10A)。また、関節軟骨細胞、およびその周辺の線維組織の一部には

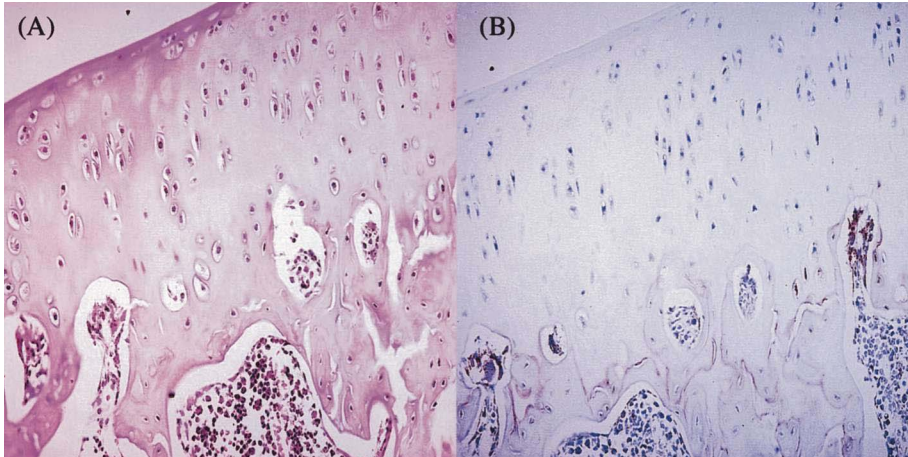


Fig. 9. Effects of EHDP on histopathology of the knee joint of CIA rats. (A) HE staining, $\times 200$; (B) TRAP staining, $\times 200$.

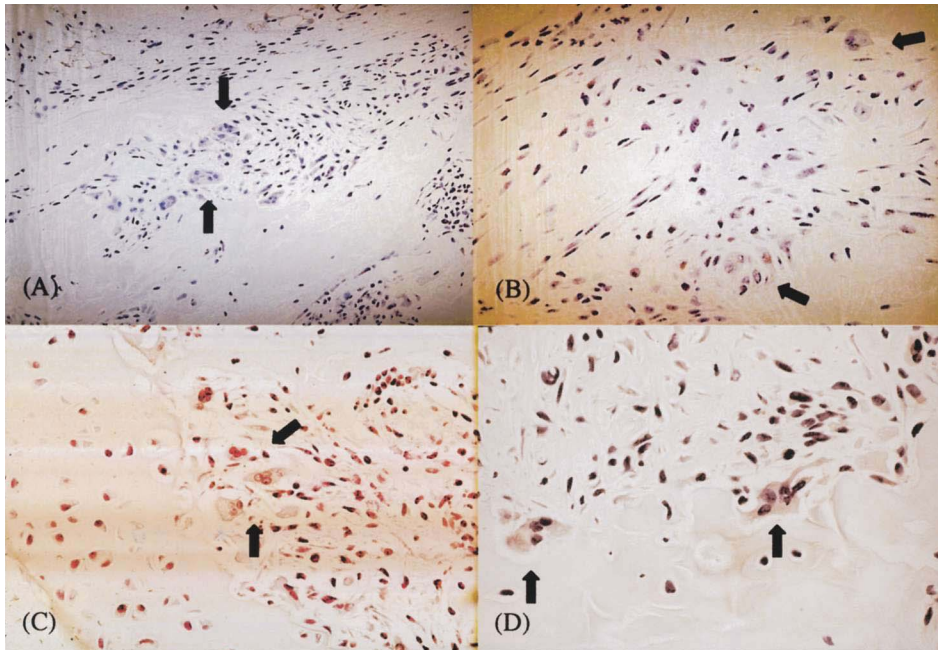


Fig. 10. Immunohistochemical staining of a knee joint of MRL/l mice at age of 4 weeks (A, B) and CIA rats at 2 weeks after immunization (C, D). The staining was done using specific antibodies against calcitonin receptor (CTR), CD68 and c-Fos. (A) CTR positive cells (arrows) were observed a part of TRAP positive multinucleated giant cells accumulated in periphysis in MRL/l mice ($\times 200$). (B) C-Fos positive cells (arrows) were observed chondrocytes in deep zone of the articular cartilage and fibrous tissue in periphysis in MRL/l mice ($\times 400$). (C) CD68 positive multinucleated cells (arrows) in islands and subchondral bone in CIA rats ($\times 400$). (D) In islands, chondrocytes in deep zone of the articular cartilage, and fibrous tissue in subchondral area, c-Fos positive cells (arrows) were observed in CIA rats ($\times 400$).

c-Fos 陽性を示す細胞も観察された (Fig. 10B). CIA ラットの対照群では、軟骨下骨に集積する多核大型細胞の一部に CD68 陽性細胞を認めた

(Fig. 10C). また、MRL/l マウスと同様の部位に c-Fos 陽性細胞を認めた (Fig. 10D).

一方、いずれのマウスにおいても、薬剤投与群

では、CTR, CD68, c-Fos 陽性を示す細胞はほとんど認められなかった。

IV. 考 察

Fujii ら¹²⁾⁶⁾ は、発症して間もない時期の RA 患者からは、血清中に関節軟骨で合成される II 型コラーゲンに特異的な IgG クラスの自己抗体が高率に検出されることを見出している。また、動物に II 型コラーゲンを感作すると、RA にきわめて類似した関節炎が発症するが、こうしたコラーゲン関節炎 (CIA) ラットにおいても、RA 患者と同様に、関節炎の発症に先立って、血清中には II 型コラーゲンに対する抗体が出現することも明らかとなり¹⁵⁾¹⁶⁾、これらの事実は、RA の病因に、II 型コラーゲンに対する自己免疫現象が深く関与していることを強く示唆するにいたっている。さらに、辻、田中ら^{7)8)17)~20)} は、CIA ラットならびに MRL/l マウスの関節軟骨および軟骨下骨髄の初期病変についてヒト RA と比較検討を行った結果、これらのモデル動物では、関節滑膜に明らかな炎症所見が出現する以前より、軟骨下骨髄には破骨細胞様の多核大型の細胞が集積し、極めてヒト RA に近い病像を呈することを見出している。

一方、ビスホスホネートは 2 つの C-P 結合を特徴とする化合物で、一般的にはダイホスホネート (diphosphonates) と呼ばれるが、なかでも 2 つの結合が同じ炭素原子上にある (P-C-P 結合) ゲミナルビスホスホネート (geminal bisphosphonate) は、*in vivo* で骨に特異的に分布し、強力な骨吸収抑制作用を発現することが明らかにされている。本研究の結果、MRL/l マウスでは、対照群においても、関節炎による肉眼的関節腫脹はほとんど観察されないため、関節炎の進展に対する EHDP の効果は明らかではなかったが、EHDP を投与した CIA ラットでは、関節炎の発症と paw volume の増加が遅延されたことから、本薬剤が関節炎の発症・進展に関わる何らかの因子を抑制した可能性が示唆された。

そこで、こうした EHDP の作用について病理組織学的に検討した。その結果、MRL/l マウスおよび CIA ラットの対照群においては、滑膜の増殖を認めない早期から periphysis や関節軟骨下骨に多核の大型細胞の集積が観察された。また、こ

の大型細胞は TRAP 染色陽性であり、その細胞の中にはカルシトニンレセプターを有するものが認められた。一方、EHDP の投与は、periphysis にみられるこれらの TRAP 陽性多核大型細胞数を有意に減少させた。また、カルシトニンレセプターを有する大型細胞もほとんど観察されなかった。TRAP の保有ならびに細胞表面のカルシトニンレセプターは、破骨細胞のマーカーとされており、とくに、カルシトニンレセプターは分化活性化した破骨細胞に発現することが知られている。したがって、EHDP は、MRL/l マウスならびに CIA ラットの滑膜炎の発症に先立って関節近傍の軟骨下への破骨細胞様細胞の集積とその活性化を抑制するものと考ええる。

さらに、MRL/l マウスならびに CIA ラットの対照群の関節では、関節滑膜に明らかな炎症所見が出現する以前に、関節軟骨の深層の軟骨細胞ならびに軟骨直下の骨髄に集積する間葉系細胞と考えられる紡錘形細胞の一部に、癌遺伝子の 1 つである *c-fos* の発現を示す c-Fos 蛋白に対する抗体で染色される細胞が観察されたが、EHDP の投与によりこうした c-Fos 陽性の細胞数も抑制された。辻らは、関節破壊がいまだ軽度である RA 患者の関節においても、軟骨深層の軟骨細胞ならびに軟骨下骨髄に集積する細胞にも早期より *c-fos* が発現していることを報告している。また、これらの細胞での *c-fos* 発現は、軟骨細胞においては軟骨マトリックスの産生を抑制し、これらのマトリックスの分解酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼとそのインヒビターの良好なバランスを壊すとともに、軟骨下骨髄では、破骨細胞への分化、活性化に影響を与えている可能性を見出している⁷⁾⁸⁾¹⁷⁾。さらに、近年、*c-fos* ノックアウトマウスでは、破骨細胞の分化、活性化が欠除するためにヒト大理石骨病様の病態を呈することから、*c-fos* 遺伝子が骨髄中の前駆細胞の破骨細胞への分化とその活性化に極めて重要な遺伝子であることも明らかにされている²¹⁾。一方、ビスホスホネートの破骨細胞への作用は、細胞数を減少させ、さらに活性を低下させるものである。すなわち、破骨細胞のリクルートメントの抑制、破骨細胞の骨への接着の抑制ならびにアポトーシスの早発による破骨細胞の寿命の短縮などの効果は、破骨細胞

数の減少をもたらすと考えられる。また、破骨細胞の細胞骨格への作用あるいは細胞間情報伝達系への作用は、破骨細胞活性の低下をもたらすと考えられるが、その機序の詳細についてはいまだ明らかではない。したがって、EHDPによるMRL/lマウスならびにCIAラットの軟骨下骨髄での効果は、主として、こうしたEHDPの破骨細胞に対する直接作用によるものと考えられるが、その一部は、本薬剤による前駆細胞における*c-fos*発現を介した破骨細胞の分化、活性化への抑制作用によるものである可能性も考えられる。

次に、EHDPのII型コラーゲンに対する自己免疫現象に与える影響について検討するため、血清中の抗II型コラーゲン抗体の推移を測定した。MRL/lマウスの対照群では、4~5週から血清中にはII型コラーゲンに対する抗体の上昇が確認された。また、CIAラットの対照群では、これまでの著者らの知見と同様に、関節炎発症以前よりIgMタイプの抗体が上昇し、そのピークに引き続いてIgGタイプの抗体が上昇し続ける動きが観察された。一方、MRL/lマウスおよびCIAラットのいずれにおいても、EHDPのII型コラーゲン抗体に対する作用は、対照群に比較して有意なものではなかった。しかし、MRL/lマウスでは生後80日以降、CIAラットでは3週以後、EHDP投与群の抗体値の上昇は対照群に比べて低く抑えられる傾向が観察された。こうした傾向は、主としてEHDPによる骨関節破壊の抑制が、これに継続して生じる免疫現象にも抑制的に働いた結果生じたものと考えられる。

最近の研究では、ビスホスホネートには、破骨細胞に対する作用以外にも鎮痛作用、抗炎症作用、血管石灰化抑制作用などの多彩な作用があり²²⁾²³⁾、とくに、新たな標的細胞としてマクロファージに対しては、ある種の条件下において、IL-1 β 、IL-6、TNF- α などの産生を抑制する作用のある可能性が見出されている。本研究結果においても、MRL/lマウスならびにCIAラットの対照群では、TRAP陽性の大型細胞の一部にCD68陽性を示す細胞が存在し、これらはマクロファージ系の細胞と考えられるが、EHDPの投与はこうしたCD68陽性細胞の出現も抑制することが観察されている。したがって、本研究結果で認められ

たEHDPによる免疫現象に対する作用は、主として破骨細胞に対する作用に付随するものと考えられるが、その一部はマクロファージに対する作用を介する可能性も考えられ、この点については、今後も検討を加えていく必要がある。

以上、MRL/lマウスならびにCIAラットに対するEHDPの早期投与は、periphysisならびに軟骨下骨髄に集積する活性化した破骨細胞様細胞に作用し、骨・軟骨破壊を抑制するとともに、これに続くII型コラーゲンに対する自己免疫応答に対してもこれを減弱する方向へと作用し、関節炎の発症・進展を抑制することが判明した。Fujiiらは⁶⁾、RAの骨関節破壊は、滑膜組織にのみ依存するものではなく、その発症と進展には、軟骨細胞や軟骨マトリックスに生じる変化、さらにはこれらの変化と軟骨下の骨髄組織にみられるTRAP陽性細胞などの細胞間でのinteractionがきわめて重要であることを報告している。したがって、EHDPの投与により得られた知見は、RAの関節破壊のメカニズムの解明のみならず、RAを発症初期から抑制でき得る新たな治療薬の開発に有効な糸口を与えるものと考えられる。

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜りました東京慈恵会医科大学整形外科科学講座藤井克之教授に深謝いたします。また、研究に際しご指導頂きました同講座辻美智子講師に心よりお礼申し上げます。

文 献

- 1) 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* 1989; 124: 63-70.
- 2) Fujii K, Tsuji M, Kitamura A, Murota K. The diagnostic significance of anti-Type II collagen antibody assay in rheumatoid arthritis. *Int Orthop* 1992; 16: 272-6.
- 3) 藤井克之. RAの早期診断の試み: 抗コラーゲン抗体を指標として. *医のあゆみ* 1984; 131: 303.
- 4) 藤井克之. 関節炎とコラーゲン免疫. *日整会誌* 1990; 64: 112.
- 5) 藤井克之. 早期リウマチと抗II型コラーゲン抗体の関係. *リウマチ科* 1994; 12: 332.
- 6) Fujii K, Tsuji M, Tajima M. Rheumatoid arthritis: A synovial disease? *Ann Rheum*

- 1999; 58: 727-30.
- 7) Tsuji M, Hirakawa K, Kato A, Fujii K. Possible role of *c-fos* expression in rheumatoid cartilage destruction. *J Rheum* 2000; 27: 1606.
 - 8) Tsuji M, Tanaka M, Hayashi H, Koshiishi S, Fujii K. Possible role of *c-fos* expression in rheumatoid joint destruction. *Mod Rheumatol* 2001; 11: 17-22.
 - 9) Koga T, Sakamoto S, Onoue K, Kotani S, Sumiyoshi A. Efficient induction of collagen arthritis by the use of a synthetic muramyl dipeptide. *Arthritis Rheum* 1980; 23: 993-7.
 - 10) Trentham DE, Townes AS, Kang A. Autoimmunity to type II collagen: an experimental model of arthritis. *J Exp Med* 1977; 146: 857-68.
 - 11) Terato K, Shimozuru Y, Katayama K, Takemitsu Y, Yamashita I, Miyatsu M. Specificity of antibodies to type II collagen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 1493-550.
 - 12) Suda T, Takahashi N, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation. *Endocrine Rev* 1992; 13: 66-80.
 - 13) Cole AA, Walters LM. Tartrate-resistant acid phosphatase in bone and cartilage following decalcification and cold-embedding in plastic. *J Histochem Cytochem* 1987; 35: 203-6.
 - 14) Oestreich AE, Ahmad BS. The periphysis and its effect on the metaphysis: 1. Definition and normal radiographic pattern. *Skeletal Radiol* 1993; 22: 115-9.
 - 15) Tsuji M, Fujii K, Nakano T, Nishii Y. 1α -hydroxyvitamin D3 inhibits Type II collagen-induced arthritis in rats. *FEBS Lett* 1994; 337: 248-50.
 - 16) 北村 淳. 慢性関節リウマチの病態モデルとしてのコラーゲン関節炎に対するビタミンD3誘導体の効果に関する研究. 日整会誌1994; 68: 1068-80.
 - 17) 辻美智子, 舟木清美, 向千恵美, 藤井克之. AP-1ヌクレオチドによるRAにおける骨・軟骨破壊の抑制: コラーゲン関節炎を用いた検討. 現代医療2001; 33: 1207-11.
 - 18) 田中眞希, 澤井高志, 永瀨龍彦, 望月静枝, 藤井克之. 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. 炎症1997; 17: 129-34.
 - 19) 田中眞希. 慢性関節リウマチの関節破壊機序に関する研究: リウマチモデルであるMRL/Mp-*lpr/lpr* (MRL/l)マウスを用いた免疫組織学的検討. 慈恵医大誌1999; 114: 487-95.
 - 20) Tanaka M, Fujii K, Tsuji M, Sawai T. Autoimmune reaction to type II collagen and cartilage degeneration in MRL/Mp-*lpr/lpr* mouse. *Rheumatol Int* 2004; 24: 84-92.
 - 21) 松尾浩一. 破骨細胞の分化を調節するFosの役割. *The Bone* 1998; 12: 85-9.
 - 22) 田中伴由起, 中山達雄, 勝又 隆. 鎮静作用を併せ持つ骨粗鬆症治療薬: エチドロネートの多様な薬理作用. *Bio Clin* 2001; 16: 237-41.
 - 23) 平野敬子. 炎症とビスホスフォネート. *Clin Calcium* 2003; 13: 128-33.