

Rheumatoid Arthritis (RA) モデルラットにおける 膝関節および顎関節の組織学的評価

藤崎 昇

大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再建学講座
(主指導教員：中村 浩彰 教授)

松本歯科大学大学院歯学独立研究科博士（歯学）学位申請論文

Histological evaluation for knee joint and temporomandibular joint (TMJ) in
rheumatoid arthritis (RA) model rat

NOBORU FUJISAKI

*Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University
(Chief Academic Advisor : Professor Hiroaki Nakamura)*

The thesis submitted to the Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University, for the degree Ph.D. (in Dentistry)

要 旨

〔目的〕

関節リウマチ (rheumatoid arthritis : RA) は罹患者の Activity of Daily Living (ADL) や Quality of Life (QOL) を著しく侵害する疾患である。しかし、RA は発症要因が複雑であるうえに経過が長い疾患であり、患者各々において発生の初期からその経過をたどることは極めて困難である。また、RA 患者の成人と小児ともに症例の約50%が、顎関節部 (TMJ) にまで病変が及んでいるといわれているが、他の四肢関節に比して RA に罹患した TMJ の経時的变化を追った報告は極めて少ないのが現状である。そこで顎関節の RA 発症機構と経過、進行抑制要因をより詳細に

検討するために、RA モデルとしては病因、免疫学的基本原理が最も解析されているコラーゲン誘発性関節炎 (CIA) ラットを作製し、膝関節と顎関節を組織学的に比較、観察した。

〔材料と方法〕

実験にはメスの6週齢 Lewis ラットを用いた。0.3%ウシ関節由来タイプIIコラーゲンと Freund's Adjuvant Incomplete を1:1の割合で混和、エマルジョンを作製し、ラット背部および後頭部に皮内投与した。初回に1 ml、一週間後に0.5mlのエマルジョンを初回と同部位に接種して感作した。なお、2週例のラットには2回目の感作後1週間目に1回、4週例のラットには2回目の感作後1週毎に3回の追加接種を行なった。その後1, 2, 4週間目にデジタルカメラお

および micro CT による撮影を行い、4%パラホルムアルデヒド液を含む固定液を用いて灌流固定し、膝および顎関節部を採取した。パラフィン包埋した試料から厚さ 5 μm の連続切片を作製し、組織学的評価を行った。免疫組織化学的手法および酵素組織化学的手法として、軟骨基質の検出には抗 Type II コラーゲン抗体、マクロファージのマーカーとして抗 CD 68 抗体、破骨細胞のマーカーには抗カテプシン K 抗体および酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (TRAP) 染色を用いて検索した。

[結果]

1. 感作後 1 週目において四肢に軽度の発赤と腫脹がみられ、micro CT による観察では膝関節軟骨表面に僅かな粗造化が認められた。組織学的には、まず滑膜の増殖が起こり、続いて軟骨表面に滑膜の異常な増殖により発生した炎症性肉芽組織であるパンヌスの浸潤がみられた。また増殖滑膜中には CD 68 陽性細胞を示すマクロファージが多数認められた。一方、顎関節部では micro CT による観察および組織学的評価において変化は確認できなかった。

2. 感作後 2 週目では四肢の発赤と腫脹は増加し、後肢を引きずる歩行障害がみられた。膝関節の組織学的評価では、増殖滑膜によるパンヌスが関節軟骨から骨髄側へ浸潤し、軟骨基質の連続性が絶たれていた。しかし顎関節ではコントロール群との差は認められなかった。

3. 感作後 4 週目での micro CT の所見において、関節頭の粗造化と破壊が明瞭に認められた。膝関節における骨破壊は進行し、関節頭は著しく変形した。また骨破壊部位には TRAP、カテプシン K および CD 68 陽性を示す破骨細胞が多数出現した。顎関節では滑膜内に CD 68 陽性マクロファージの出現がみられるものの、滑膜の肥厚や骨破壊は観察されなかった。

[結論]

TRAP 染色および免疫組織化学的染色により、RA モデルラットの膝関節の破壊過程は、初期では滑膜の増殖とマクロファージ浸潤に始まり、次いで破骨細胞の分化、活性化が亢進して関節破壊が進行することが示唆された。

顎関節では初期変化がなく、4 週目に関節軟骨移行部位である bare area にマクロファージが出

現した。しかし、軟骨層の破壊や破骨細胞の出現は観察されず、病態の重篤化は認められなかった。顎関節では関節円板や線維層が存在するという構造的な違いに加えて、荷重の負担などの違いにより、膝関節に比して RA 様病変の発症率が低いと考えられた。本実験により、CIA ラットは軽微な顎関節の RA 様病変が誘発されていることが明らかとなり、顎関節の RA モデルとして有用であることが示された。

緒 言

高齢社会を迎えたわが国では様々な疾病に罹患する人々が増加傾向にあり、このような社会的状況において人々の Quality of Life (QOL) を維持することは重要である。関節リウマチ Rheumatoid Arthritis (RA) は罹患者の QOL を侵害し Activity of Daily Living (ADL) を低下させる疾患の 1 つであり、進行すると日常生活に多大な影響をおよぼす。RA は様々な要因により発症、進行する炎症性疾患であり、1 つの関節のみならず複数の関節に腫れと痛みを生じ、慢性に経過し、最終的には関節変形や高度運動障害に至る^{1,2)}。このような RA の進行過程を通して罹患者の肉体的、精神的苦痛は大きい。RA 発症の原因が遺伝や環境など様々な要因を含む多因子疾患であることに加え、症状がきわめて多彩であるため病態を把握し難いことが、RA の治療を困難にしている³⁾。

歯科領域では、RA に罹患した顎関節およびその不調和に付随して発生した咬合の回復を治療対象としているが、顎関節における RA の経時的観察に関する報告はきわめて少ない^{4,5)}。このことは、顎関節は RA に罹患する時期が最も遅い関節であること、顎関節にまで RA が及ぶのは RA 患者全体の約 20~50% であることなどが影響していると思われる^{5,6)}。しかしながら四肢関節を侵した RA が顎関節にまで及ぶと、小児では下顎の発育障害や顔面変形をきたし、成人では腫脹や疼痛以外にも、骨破壊の進行により前歯部開咬や関節強直による顎運動制限が起こる⁶⁾。高齢発症の関節リウマチも増加傾向にあり、今後は歯科領域においても顎関節軟骨の変形により崩壊した咬合の再構築、疼痛や強直の緩和に対する治療の需要は高まるものと考えられる。これらを考慮したうえ

で、顎関節に存在が示唆される RA 阻害要因，進行抑制のメカニズム，そして病態をさらに明確にするためにはモデル動物による解析が必要であると考えられる。

RA による四肢関節の破壊過程に注目した研究は多数報告されているものの^{7,8)}，顎関節と四肢関節を比較検討した報告はみられない。本研究では RA に近い病態を示し，再現性に優れた RA モデル動物として理想的である Collagen Induced Arthritis (CIA) ラット^{9,10)}を用い，膝関節と顎関節における RA の発症過程を経時的に比較・観察し，組織学的評価を行った。

実験材料及び方法

CIA ラットの作製

実験にはメスの 6 週齢 Lewis ラット 21 匹を用いた。ラットは感作法と飼育期間に従って 1，2，4 週例の 3 群に分け，実験群各 5 匹，対照群各 2 匹を作製した。

0.3%ウシ関節由来タイプ II コラーゲン（ニッピー，東京）と Freund's Adjuvant Incomplete (Sigma Aldrich Co, St Louis, Mo) を 1 : 1 の割合でホモジナイザーにて混和し，エマルジョンを作製した。ジエチルエーテル（Wako，東京）による麻酔下のラットに，さらにペントバルビタール（30 mg/kg BW, Nembutal[®] Dainbot, 東京）を腹腔内に投与した後，ラット背部および後頭部の剃毛後に感作を行った。初回はエマルジョン 1 ml を尾部，背部 4ヶ所に皮内投与し，1 週間後にエマルジョン 0.5 ml を同部位に投与した。なお 2 週例のラットには 2 回目の感作後 1 週間目に 1 回，4 週例のラットには，2 回目の感作後 1 週毎に 3 回の追加接種を行なった。対象群にはアジュバントのみを同部位に皮内接種した。

本実験は「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」に基づき松本歯科大学動物実験室運営委員会の承認を得て行った。

観察方法

1. 肉眼による観察

四肢関節，特に後肢の発赤および腫脹を観察した。

2. in vivo micro CT による観察

同一個体の経時的な関節破壊と形態変化を三次

元的立体構造として観察するために in vivo micro CT (R_mCT, Rigaku, 東京) を用いた。4 週例の実験群 (n = 5) の膝関節部および顎関節部を，2 回目の感作後 1 週間毎に 4 回撮影を行った。撮影は，ペントバルビタール (30 mg/kg BW) による麻酔下で体動が生じないように固定し，左側の大腿骨と脛骨の関節部および顎関節部を，管電圧 90 μV，管電流 160 μA，拡大率 6.7 倍，撮影時間 30 秒の条件下にて行なった。三次元的立体構造構築には専用ソフト (i-view, Rigaku, 東京) を用いた。

3. 組織学的評価法

2 回目の感作後 1，2，4 週目にペントバルビタール (80 mg/kg BW) による麻酔下で，左心室より 4%パラフォルムアルデヒドを含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) にて灌流固定を行った後に，膝関節部および顎関節部を摘出し，同固定液にて 24 時間浸漬固定した。その後 10% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) で 4℃にて 3 週間脱灰し，上昇アルコールで脱水した後にパラフィン包埋し，ミクロトーム (Leica SM 2000 R, Munchen, Germany) を用いて厚さ 5 μm の連続切片を作製し，組織学的観察に用いた。組織学的評価には Hematoxylin-Eosin (H-E) 染色にて CIA の進行概要を観察した。また破骨細胞の検索には，naphthol AS-BI phosphate (Sigma Aldrich Co)，fast red violet LB salt (Sigma Aldrich Co)，50 mM 酒石酸ナトリウムを含む 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に 37℃，30 分間浸漬して酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (TRAP) 染色を行った¹¹⁾。免疫組織化学染色を行う際には，前処理として内因性ペルオキシターゼ除去のために 3%過酸化水素水にて 20 分間処理し，10% bovine serum albumin (BSA) を含むリン酸緩衝液にて非特異反応のプロッキング後，一次抗体を 4℃にて 24 時間反応させた。なお II 型コラーゲンの検出には前処理としてヒアルロニダーゼ処理を 37℃にて 20 分間行った。一次抗体は，軟骨基質のマーカーとして抗 II 型コラーゲン抗体 (SPM 239, Spring Bioscience, Fremont, CA)，マクロファージ系細胞のマーカーとして抗 CD 68 抗体 (ED 1, Serotec Ltd, Oxford, UK)，破骨細胞のマーカーとして抗ヒト・カテプシン K 抗体 (182-12G 5, 第一ファインケミカル，東京) を

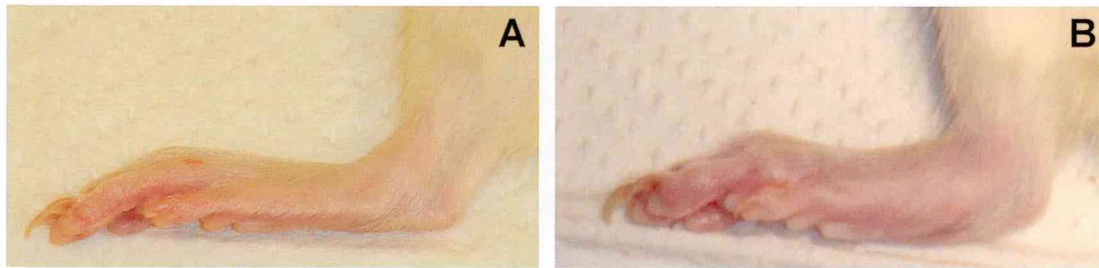


図1：肉眼所見（後肢）

- A：CIA 感作後1週目 軽度の発赤と腫脹がみられる。
B：CIA 感作後4週目 著しい発赤および腫脹が認められる。

用いた。なお各染色ともにネガティブコントロールには一次抗体を含まない溶液を用いた。二次抗体としてヒストファインシンプルステイン MAX-PO MULTI（ニチレイバイオサイエンス、東京）を室温にて1時間反応後、発色剤として ENVISION キット/HRP DAB（Dako ジャパン、東京）を用いて3～5分間反応させた。CIA ラットにおける RA 初期病変の指標にはマクロファージの出現状況を用いた。中拡大（20倍）で観察し、CD 68陽性細胞数が5個以上（5/medium power field：MPF）を RA 様病変と定義した。

結 果

1. 膝関節における所見

1) 肉眼所見

感作後1週目では後肢に軽度の発赤と腫脹が認められた。2週目では症状が末梢関節にまで及び、前後肢の指にも発赤と腫脹が見られた。4週目になると歩行障害が生じるとともに発赤と腫脹が顕著になり、変形性関節炎（OA）様の症状を示した（図1）。

2) in vivo micro CT による所見

感作後1週目では大腿骨の膝関節面は比較的平滑で、コントロール群との差はほとんど認められなかった（図2 A）。2週目には関節表層にわずかな粗造化が認められたが、骨の形態変化には至らなかった（図2 B）。感作後3週目では、より粗造化が進行し、関節形態が不明瞭になり、骨にまで破壊が進行した（図2 C）。4週目では骨の吸収がさらに進み、関節形態は著しく破壊された（図2 D）。

3) 組織学的所見

RA 様病変（CD 68 > 5/MPH）は、感作後1週目で5匹中4匹（80％）に、2週例および4週

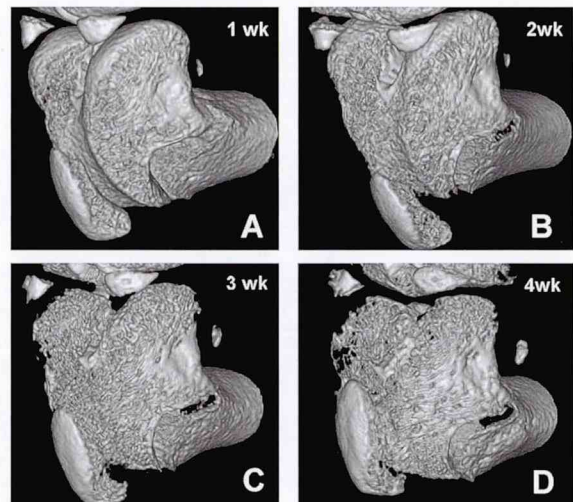


図2：in vivo micro CT による膝関節の所見

- A：CIA 感作後1週目 関節面は平滑である。
B：CIA 感作後2週目 関節表層にわずかな粗造化がみられる。
C：CIA 感作後3週目 関節面の粗造化が進行し、関節の形態が不明瞭になっている。
D：CIA 感作後4週目 骨の吸収が進行し、関節形態が著しく破壊されている。

例では5匹中5匹（100％）に観察され、15例中計14匹で発症していた。

RA の進行概要を観察するために H-E 染色にて検討を行なった。感作後1, 2, 4 各週において同週例コントロールの関節表面は緩やかな湾曲を描き、軟骨組織で覆われていた。表層はやや扁平な軟骨細胞、中層は卵円形の軟骨細胞、深層は肥大軟骨細胞から構成され、各層に乱れは観察されなかった（図3）。

感作後1週例では、滑膜と軟骨の移行部である bare area において、滑膜の増生が顕著になり、また滑膜が軟骨表層を薄く覆う部位も認められた（図4）。2週例になると滑膜は肥厚して炎症性の肉芽組織であるパンヌスを形成し、軟骨層への浸潤がみられた。このような部位では関節軟骨の

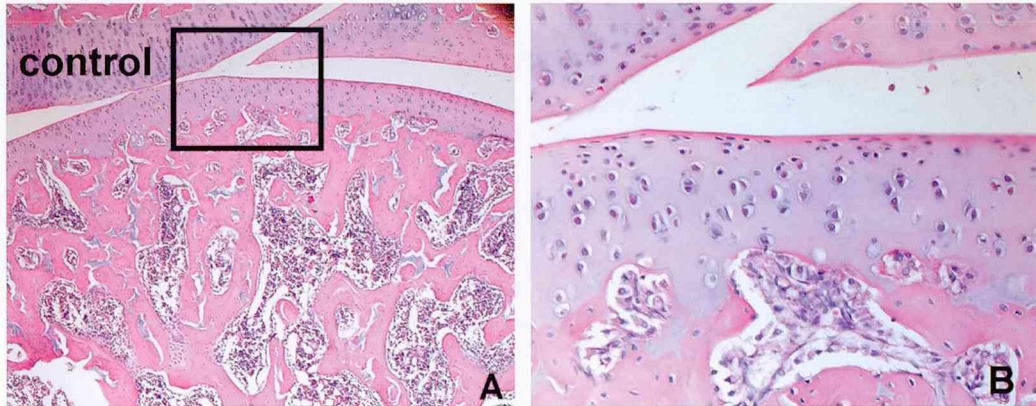


図3：コントロール1週目の膝関節組織像 H-E 染色

A：×5 B：Aの拡大像 ×20

関節は緩やかな湾曲を描く軟骨組織で覆われており，軟骨細胞の配列に乱れは見られない。

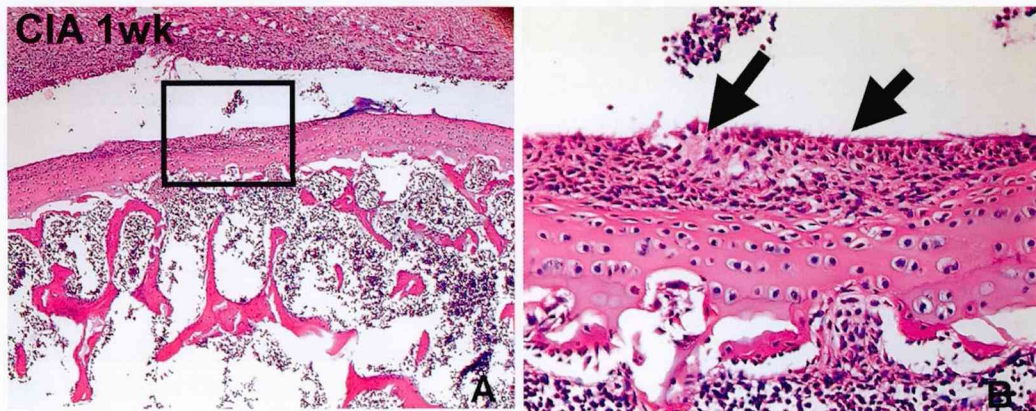


図4：感作後1週目の膝関節組織像 H-E 染色

A：×5 B：Aの拡大像 ×20

関節表層は肥厚した滑膜（矢印）により覆われている。

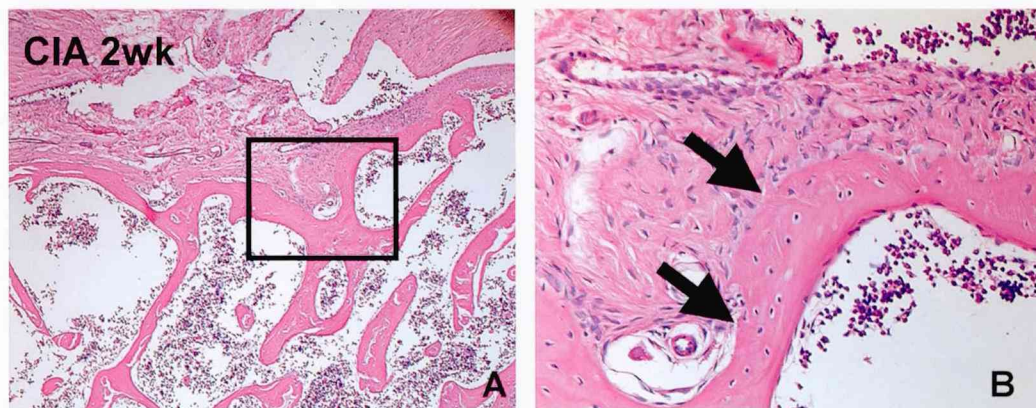


図5：感作後2週目の膝関節組織像 H-E 染色

A：×5 B：Aの拡大像 ×20

パンスが軟骨へ浸潤（矢印）し，軟骨は破壊されている。

各層は不規則になり関節形態も不明瞭になった（図5）。4週例では軟骨破壊の進行に加え，パンスはさらに増生して骨組織にまで浸潤し，骨破壊が認められた（図6）。軟骨破壊の進行を観

察するために，Ⅱ型コラーゲンの局在を免疫組織化学的に検索した。コントロールの関節はⅡ型コラーゲン陽性の軟骨基質により覆われていた（図7A）。CIAラットにおける1週例では，Ⅱ型コ

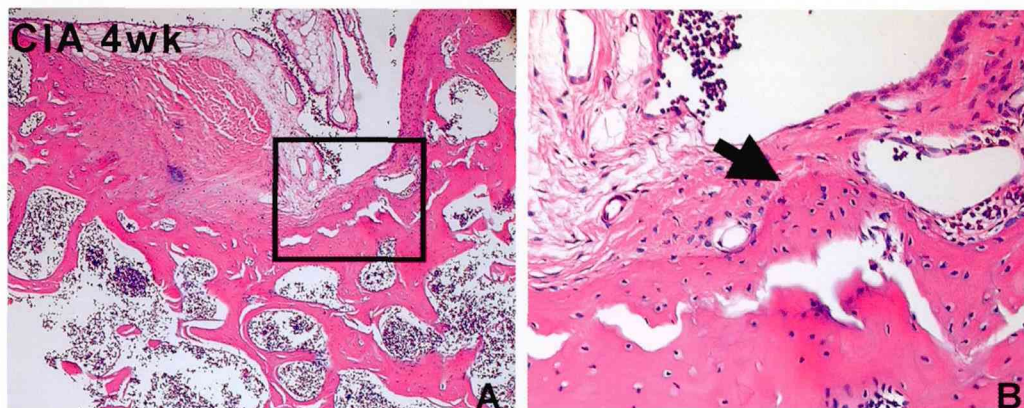


図6：感作後4週目の膝関節像 H-E染色
 A：×5 B：Aの拡大像 ×20
 パンヌスは骨組織にまで浸潤（矢印）し、骨破壊が進んでいる。

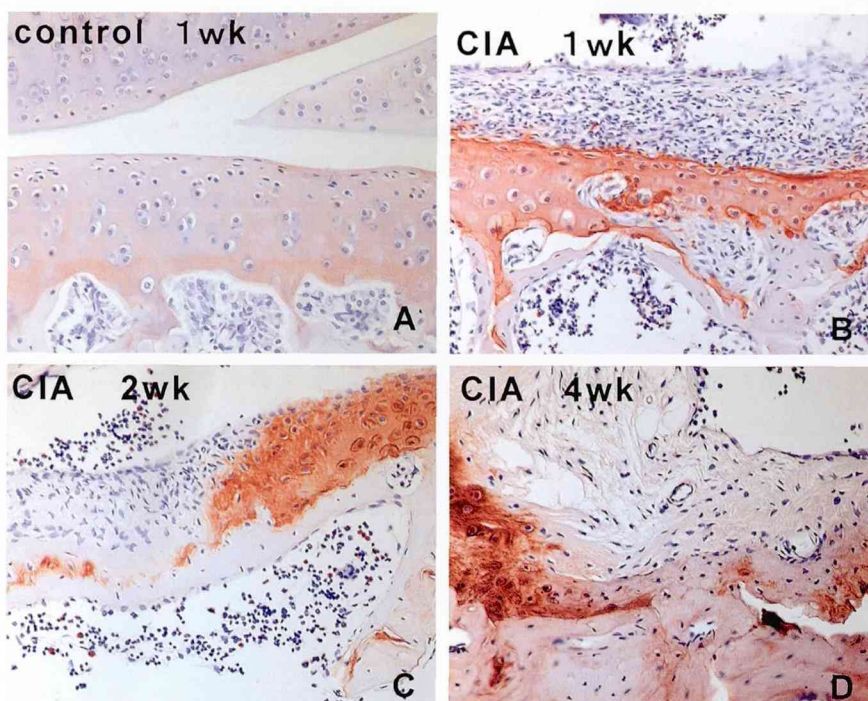


図7：膝関節におけるⅡ型コラーゲン局在を示す免疫染色像
 A：コントロール1週目 ×10
 膝関節はⅡ型コラーゲン陽性の軟骨基質に覆われている。
 B：CIA感作後1週目 ×10
 関節表面は肥厚した滑膜によりおおわれているが、軟骨基質の連続性は保たれている。
 C：CIA感作後2週目 ×10
 軟骨基質の連続性は絶たれており、パンヌスの浸潤が見られる。
 D：CIA感作後4週目 ×10
 関節は破壊され、Ⅱ型コラーゲン陽性を示す軟骨基質は不規則な分布を示している。

ラーゲン局在を示す軟骨基質に接して肥厚した滑膜がみられたが、関節を覆う軟骨の連続性は保たれていた（図7B）。2週例になるとⅡ型コラーゲン陽性を示す軟骨基質の連続性は絶たれており、分断された部位には滑膜が侵入していた（図7C）。4週例に至ると、完全に軟骨組織は破壊

されてⅡ型コラーゲン陽性を示す軟骨基質は減少し、その分布は不規則であった（図7D）。滑膜による軟骨破壊過程をより詳細に検討するため、マクロファージ系のマーカーとして抗CD68抗体を用いた免疫染色、破骨細胞のマーカーとしてTRAP染色と抗カテプシンK抗体を用いた染色

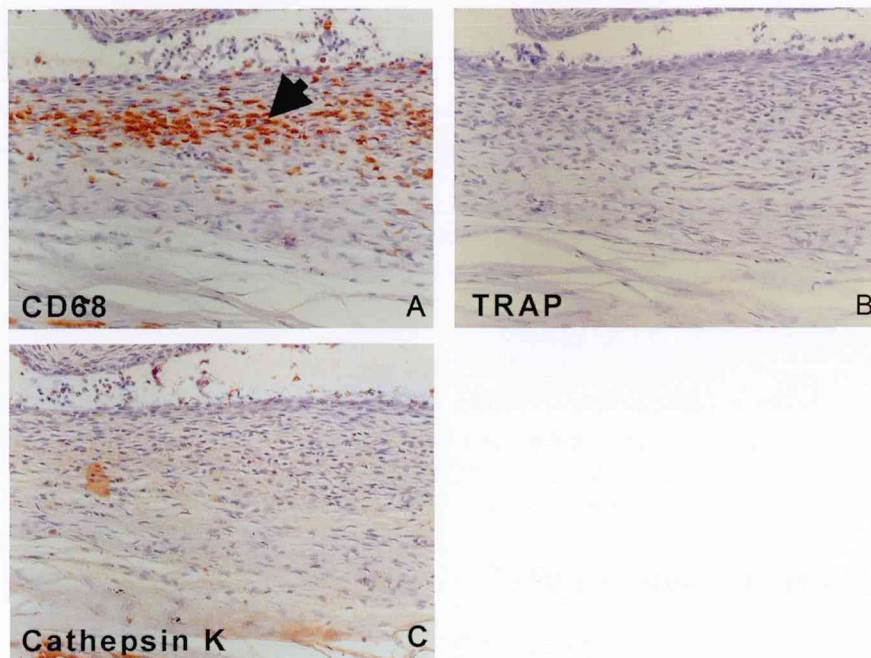


図8：感作後1週目における膝関節肥厚滑膜の組織像

A：抗CD68抗体による免疫組織化学染色像 ×20

B：TRAP染色像 ×20

C：抗カテプシンK抗体による免疫組織化学染色像 ×20

肥厚滑膜内に多数のCD68陽性細胞が認められるが(矢印)，TRAPおよびカテプシンK陽性細胞はみられない。

を行った。1週例での肥厚滑膜内にはCD68陽性細胞が多数認められ，明らかなRA様病変が出現していた(図8A)。しかし連続切片により同部位を観察したところ，TRAPおよびカテプシンK陽性細胞は認められなかった(図8B, C)。2週例ではCD68陽性細胞が軟骨基質層に接して認められるとともに(図9A)TRAP，カテプシンK陽性を示す単核および多核の細胞もみられた(図9B, C)。4週例では，肥厚滑膜内にCD68，TRAP，カテプシンK陽性細胞が認められ，骨基質に接してCD68，TRAP，カテプシンK陽性の破骨細胞が多数みられた(図10A, B, C)。

2. 顎関節における所見

1) in vivo micro CTによる所見

感作後1, 2, 4週目いずれにおいても顎関節の形態変化は認められなかった。

2) 組織学的所見

実験に用いた15匹のラットの内，試料採取時に顎関節部を損傷した実験群の3例を除き，12匹のラット顎関節を試料として用いた。各群の内訳は1週例の実験群3匹，2週例の実験群4匹，4週例の実験群5匹であった。RA様病変(CD68>5/MPF)は1, 2週例では認められなかった

(発症率0%)。しかし，4週例では片側顎関節の関節軟骨移行部(bare area)に限局してRA様病変(CD68>5/MPF)が5匹中4匹でみられ，発症率は80%であった。

H-E染色による観察では，コントロールの顎関節表面は湾曲を描き，表層は線維層により覆われていた。また増殖層，成熟層，肥大層からなる各層も規則正しく配列していた(図11A)。感作後1, 2, 4週例においても滑膜の肥厚，関節形態の変化，軟骨層の不規則化はみられず，顎関節の破壊は認められなかった(図11B, C, D)。抗II型コラーゲン抗体を用いた染色においても，全例で染色性の変化や軟骨基質連続性の喪失はみられなかった(図12A, B, C, D)。1, 2週例ではCD68，カテプシンK，TRAP陽性細胞は認められないものの，4週例のbare areaにおいてCD68陽性細胞が，滑膜の血管周囲に多数認められた(図13A, B)。しかし同部位においてもTRAPおよびカテプシンK陽性細胞は認められなかった。

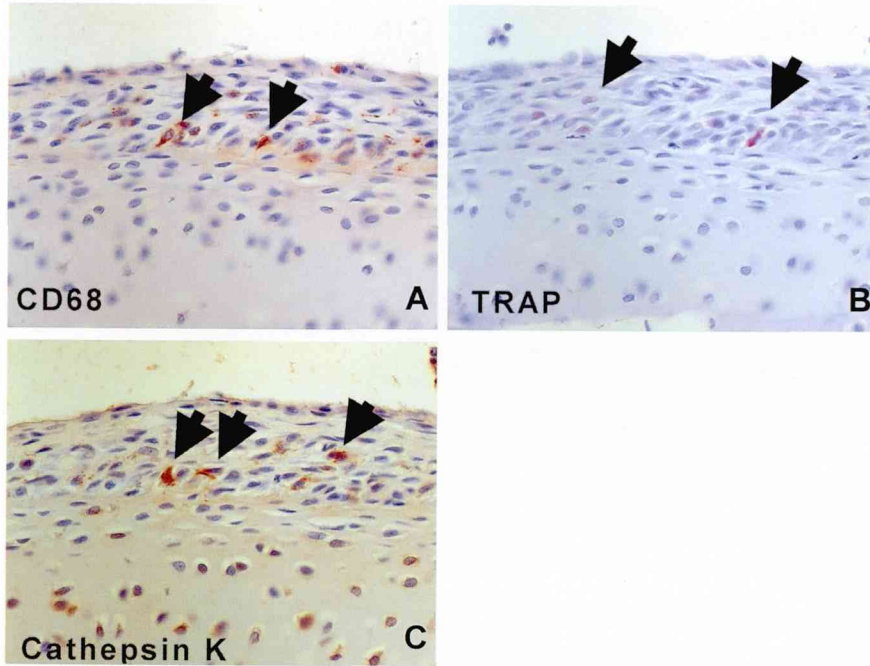


図9：感作後2週目における膝関節肥厚滑膜の組織像

A：抗 CD 68抗体による免疫染色像 ×40

B：TRAP 染色像 ×40

C：抗カテプシン K 抗体による免疫染色像 ×40

肥厚した滑膜と軟骨が接する部位に CD 68, TRAP およびにカテプシン K 陽性を示す単核細胞が認められる (矢印).

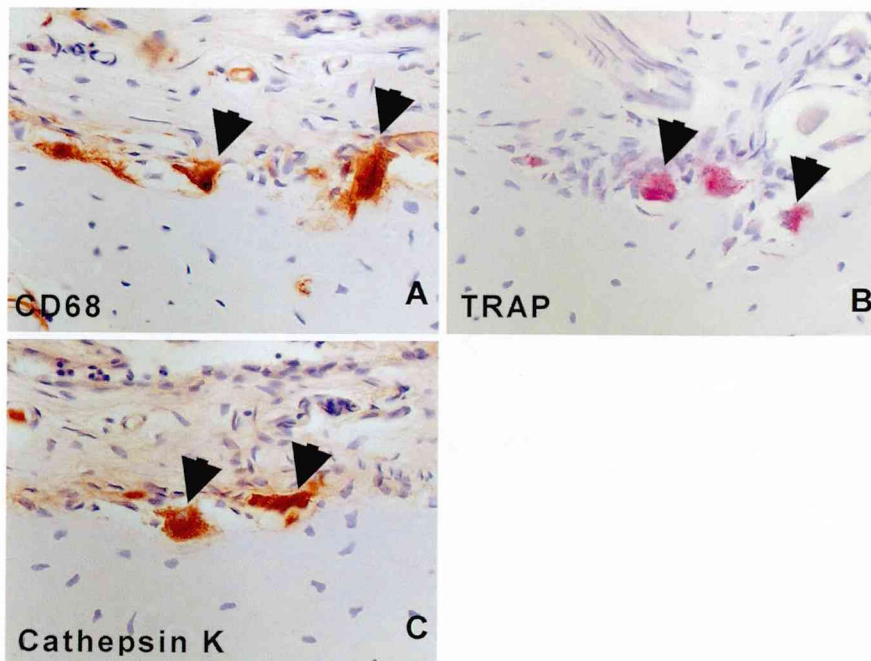


図10：感作後4週目における膝関節肥厚滑膜の組織像

A：抗 CD 68抗体による免疫染色像 ×40

B：TRAP 染色像 ×40

C：抗カテプシン K 抗体による免疫染色像 ×40

骨基質に接して CD 68, TRAP, カテプシン K 陽性を示す破骨細胞が多数認められる (矢印).

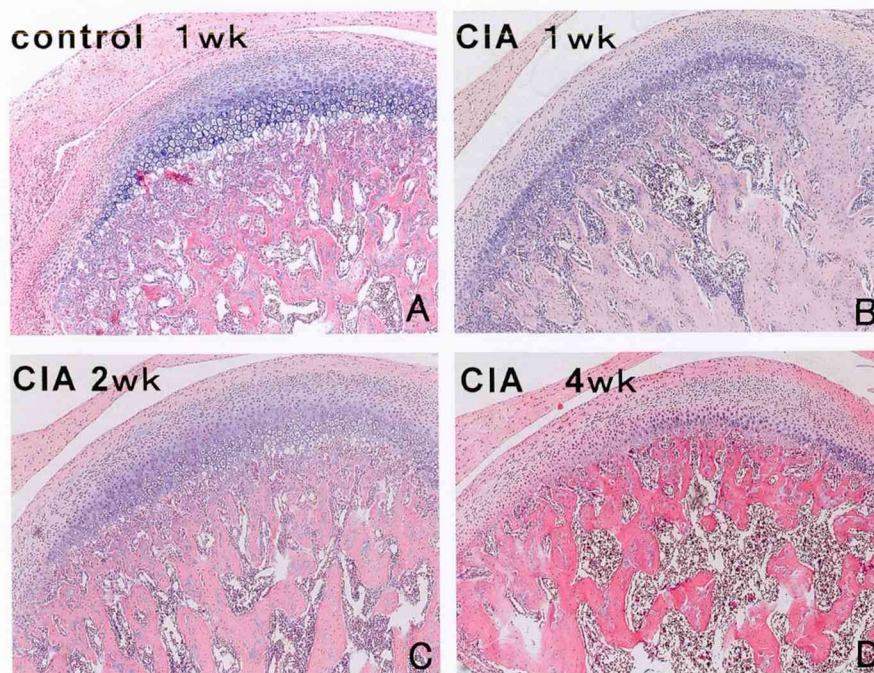


図11：顎関節の組織像 H-E 染色

- A：コントロール1週目 × 5
- B：CIA 感作後1週目 × 5
- C：CIA 感作後2週目 × 5
- D：CIA 感作後4週目 × 5

感作後1週目から4週目まで滑膜肥厚や関節形態の変化はみられず、コントロールとの差は認められない。

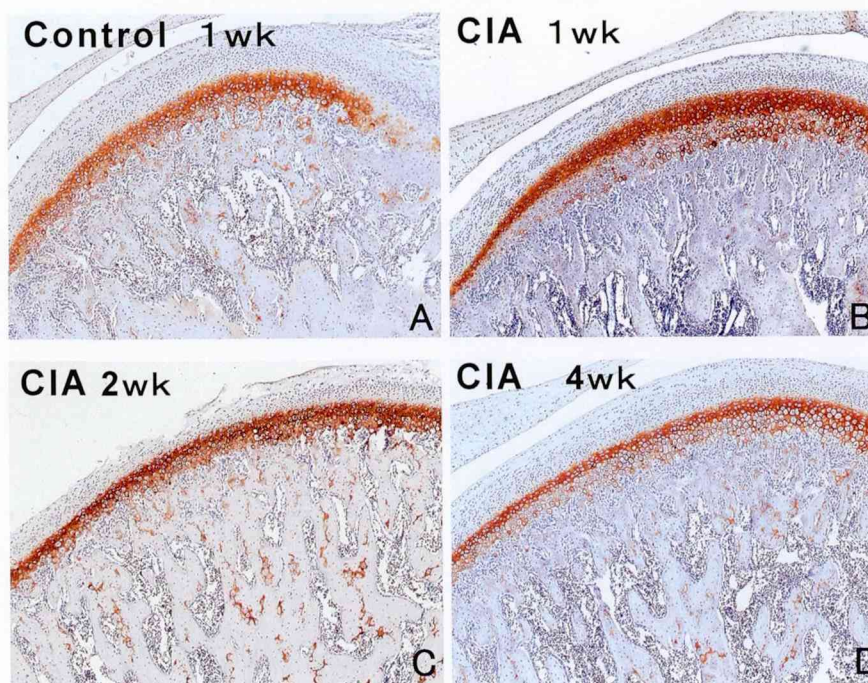


図12：抗Ⅱ型コラーゲン抗体による免疫染色像

- A：コントロール1週目 × 5
- B：CIA 感作後1週目 × 5
- C：CIA 感作後2週目 × 5
- D：CIA 感作後4週目 × 5

感作後の顎関節においてⅡ型コラーゲン局在を示す軟骨基質の連続性が保たれており、コントロールとの差は認められない。

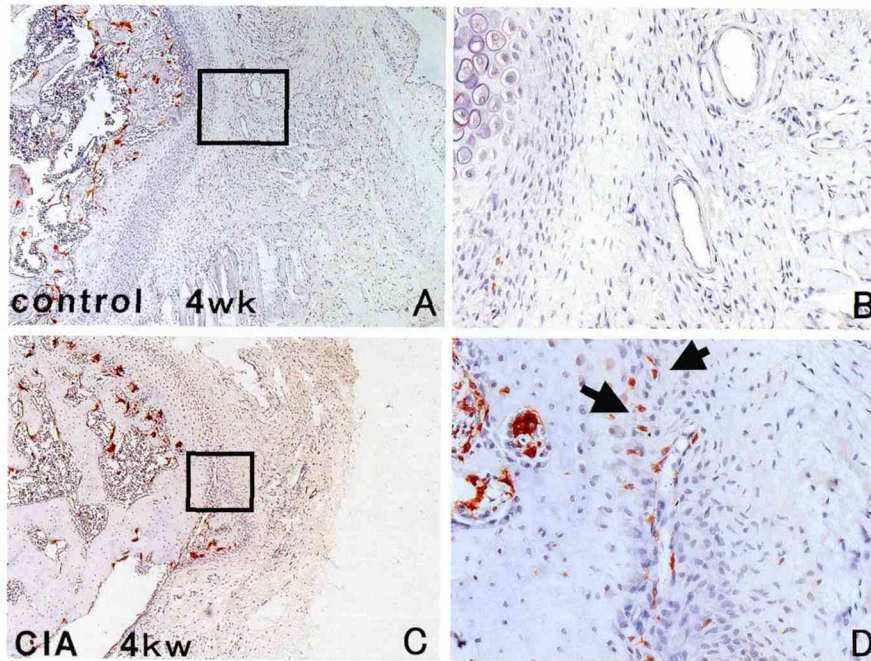


図13：顎関節のbare areaにおける抗CD68抗体による免疫染色像

A：コントロール4週目 ×5

B：Aの拡大像 ×20

C：CIA感作後4週目 ×5

D：Cの拡大像 ×20

血管周囲にCD68陽性細胞が多数認められる（矢印）。

考 察

1. RAモデルとしてのCIAラットについて

RAモデル動物としてはCIAモデル以外にも、SKGモデル、抗体誘導関節炎（AbIA）モデル、アジュバント関節炎モデル、K/BxNモデルなど様々な関節炎動物モデルが開発されている。本実験に用いたCIAモデルは比較的容易に病変を惹起させることが可能であり、その進行過程、病態においてRAに極めて近い状況を引き起こすことからRAの動物モデルとして最も広く研究されている。そのため文献的な情報も多く、実験結果を比較検討することも可能であることから本研究にCIAモデルを選択した。本実験の膝関節の結果は他の実験報告と同様の結果を示した^{9,10)}。すなわち本実験において、2回目のⅡ型コラーゲン感作後4週目に膝関節で100%という高い確率で炎症病変が惹起され、RAモデルとしての有用性が再確認できた。特筆すべきは、顎関節の発症率がⅡ型コラーゲン感作後4週目において80%であったことである。臨床的に顎関節におけるRAの発症率は20~50%との報告^{5,6)}があり、本実験で

はこの数値と異なる結果となった。これは発症基準を、病変初期に認められるマクロファージの出現に設定したことによると考えられ、今回定義したRA様病変の発症率と臨床的発症率を同等に扱うことは出来ない。しかし、発症が他の関節に比して遅延する^{5,6)}などのRAにおけるTMJの病態を反映しており、今回の研究はCIAモデルラットが顎関節リウマチにおいても有効な実験動物であることを示唆している。

一般的にRAは経過の長い疾患であり、ヒトにおける進行機序は大きく以下の4つのステージに分類される²⁾。ステージIは、関節包付着部位にある関節軟骨への移行部位（bare area）に炎症がみられる段階である。この部位は炎症による透過性が亢進しやすい有窓性毛細血管が存在しているため炎症性細胞や間葉系細胞の反応が起こりやすく、炎症の経過に伴いBリンパ球浸潤とその周囲にマクロファージの浸潤を伴うようになり、これらとほぼ同時に滑膜表層細胞の多層化が見られる。滑膜表層細胞はコラーゲンなどの細胞外マトリックスを産生するとともに、Matrix Metalloproteinase（MMP）やカテプシンなどのタンパ

ク質分解酵素を産生する。軟骨表面では軟骨の分解を示す毛羽立 (fibrillation) が起こる。ステージIIでは、軟骨の破壊が見られるようになる。滑膜は炎症性の肉芽組織であるパンヌスを形成し、軟骨の表面を覆い、タンパク質分解酵素を産生しながら軟骨を侵食する。また、パンヌスは bare area から骨髄側に侵食していく。ステージIIIでは、関節軟骨を吸収・破壊したパンヌスは骨の破壊を開始する。このステージでの破壊の主体は破骨細胞に移行する。破骨細胞は酸を分泌して、ハイドロキシアパタイトを溶解するとともに、カテプシンなどのプロテアーゼを産生分泌して、骨基質を分解し、骨を破壊する。また、軟骨は剥離消失し、向かい合った骨同士が擦り合うことにより直接的な骨の破壊が惹起される。ステージIVでは、関節硬直と骨、軟骨の再生がみられる。滑膜、関節包では炎症が沈静化し、癒着組織により関節周囲組織は変形を生じる。

コラーゲンにより炎症が誘発される CIA モデルラットは、感作後2～3週間という比較的短期間で関節の破壊が認められ、また4週以降炎症症状は徐々に消失する傾向を示す¹²⁾。本研究では、より重篤な病変状態を観察するために追加投与を3週間延長したが、病変は重篤化を示さず、4回目以降は逆に経時的に炎症が沈静化する傾向がみられた。したがって本モデルはRA初期病変の検索モデルとして有用であるものの、長期の慢性病変解析には新たなモデル動物の開発も必要であると思われる。

2. 膝関節の破壊機序について

II型コラーゲンによる四肢関節の腫脹とそれともなう一連の変化は、免疫系の活性化と関連することが報告されている^{13,14)}。炎症は、滑膜組織の増殖と関節包付着部位にある関節軟骨への移行部位 (bare area) から始まる。この部位は有窓性毛細血管が多いために、炎症性細胞の浸潤を伴う滑膜炎が起こりやすい部位と考えられている²⁾。本研究においては、感作後1週目で滑膜増殖と軽度の軟骨表層への侵食、およびマクロファージの浸潤などの炎症性変化が認められた。このことからCIAモデルではRA病変の進行が速く、感作後1週間でbare areaからすでに関節面にまで炎症が波及したものと考えられる。また

2週目では軟骨基質の破壊が進行し、関節軟骨の連続性が喪失しており、他の論文と同様の所見が確認された¹⁵⁾。これまで未石灰化軟骨基質の分解には滑膜細胞や軟骨細胞が産生する Matrix Metalloprotease-13 (MMP-13) が関与することが報告されている^{16,17)}。予備実験的に抗MMP-13抗体を用いて免疫染色を行ったが、骨細胞や骨基質内には陽性反応が認められるものの、病変部の滑膜軟骨細胞に陽性反応はみられなかった。本研究は、RA様病変の初期が滑膜増殖とマクロファージ浸潤を主体とした変化であることを示しており、これらの細胞の産生するMMP-13以外に、他のMMPsやカテプシンなどのタンパク質分解酵素が軟骨基質の破壊に関与するものと推察される。4週目に至ると滑膜の増殖に加えて骨の高度な破壊が進行し、破骨細胞が多数出現した。すなわち石灰化軟骨や骨基質の破壊は破骨細胞が担っていると考えられる。破骨細胞の分化、活性化には macrophage colony stimulating factor (M-CSF) と receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) が必須であることが明らかにされている¹⁸⁻²³⁾。RAにおいては tumor necrosis factor (TNF)- α が滑膜細胞のRANKL発現を上昇させることにより破骨細胞の分化、活性化を亢進させ、骨破壊を進行させる可能性が報告されている²⁴⁾。今回、免疫組織化学染色に有用な抗TNF- α および抗RANKL抗体を入手できなかったため、滑膜中のCD68陽性マクロファージが破骨細胞の前駆細胞となり得るかという問題点²⁵⁾および本モデルにおける破骨細胞の分化と活性化機構については今後の課題である。

3. 顎関節のRA発症について

膝関節と比して、顎関節でのRA様病変発症率は低く、また病態も軽度であった。これは両関節の機能的および構造的相違に起因するものと推察される。すなわち膝関節では荷重は垂直性にかかるため、荷重関節である膝関節軟骨に炎症が及ぶと、対合する関節面との摩擦により加速的に骨にまで到達する関節破壊が進行し、比較的早期にOA様の変形像を呈するものと考えられる。一方、顎関節にかかる荷重は咬合によるものであり、垂直性に対合する関節はなく、側頭骨と平行にわずかな面積において接するのみである。さら

に顎関節を包むように関節円板が存在し、負荷に対する緩衝材としての機能を有している。これらの要因により、膝関節のように病態の進行にともなう関節面同士の摩擦の影響を受けにくいことが推察される²⁾。また関節組織の構造的な違いとしては、膝関節表面が軟骨であることに対して、顎関節は関節表面にⅠ型コラーゲンを多量に含む線維層を有していることが挙げられる。この線維組織が摩擦効果のみならず滑液中に存在する炎症起因子物質やタンパク質分解酵素を遮断していることも要因の一つに考えられる。これに対して膝関節の関節軟骨は滑液に直に接しており、RAの滑液中にはタンパク質分解酵素が含まれているため、直接的に軟骨の破壊が、時間依存的に進行しやすい環境にあると考えられる。このことは関節破壊初期(ステージⅠ)では滑液中に分解されたⅡ型コラーゲンが観察されるとの報告により支持されている²⁾。

顎関節におけるRAの影響について、他の関節に比して研究対象とされることは少なく、解明されるべき点は多く残されている。本実験ではRAモデルによる顎関節の経時的变化を追ったが、顎関節におけるRAは他疾患との因果関係もあり、負荷の相違や組織構造の相違以外にも、咬合関係や歯周病などの要因により発症、病態に差が生じる可能性が考えられる。さらに遺伝的要因、環境要因、性差や年齢等がRAの発症および進行に及ぼす影響についての検討も必要と思われる。

RAは高度な関節破壊により罹患者の生活に多大な苦痛をもたらす疾患である。RAの病態進行状況を把握し、早期に的確な治療開始をすることが罹患者の「生活の質(QOL)」を維持するための最良の手段であり²⁶⁾、今後動物実験モデルや臨床研究により様々な問題点を詳細に解明し、より効果的な治療法の確立がなされることが望まれる。このような観点から、今回RAモデルとして使用したCIAラットの病態を検討することは、顎関節のRA発症を明らかにする一助となるものと思われる。

結 論

1. 膝関節の破壊過程について

TRAP染色および免疫組織化学的染色により膝関節の破壊過程は、RA初期ではマクロファ-

ジ浸潤に始まり、次いで破骨細胞の分化、活性化が亢進して関節破壊が進行することが示唆された。

2. 顎関節のRA様病変について

顎関節における病態変化は膝関節と比して軽微であり、発症時期も遅れる傾向を示した。顎関節では関節円板や線維層が存在するという構造的な違いに加えて、荷重の負担などの違いにより、膝関節に比してRA様病変の発症率が低いと考えられた。

3. RAモデルについて

CIAラットは高率に顎関節のRA様病変を惹起することが可能であり、顎関節RA病変の解析に有用であることが示された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、ご懇篤なる御指導と御校閲を賜りました松本歯科大学大学院歯学独立研究科硬組織疾患制御再建学講座中村浩彰教授に深甚なる謝意を表するとともに、研究計画の立案と研究の実施に際し、終始ご懇切なるご指導を賜った硬組織疾患制御再建学講座小澤英浩教授、平賀 徹准教授、二宮 禎講師に心より謝意を表します。あわせてこの研究の円滑な進展のために特別なご配慮を頂いた口腔機能制御学講座山下秀一郎教授、甘利光治特任教授そして講座の方々に深く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 須田立雄, 小澤英浩, 高橋栄明, 田中 栄, 中村浩彰, 森 諭史(2007)新骨の科学, 第一版, 263-6, 医歯薬出版, 東京.
- 2) 伊藤吉賢, 高橋幸洋, 澤井高志(2005)日本臨床, 増刊号, 関節リウマチの成因と病態生理-病理学的特徴, 96-9.
- 3) Müller-Ladner U, Pap T, Gay RE, Neidhart M and Gay S (2005) Mechanisms of disease: the molecular and cellular basis of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 1: 102-10.
- 4) Lin YC, Hsu ML, Yang JS, Liang TH, Chou SL and Lin HY (2007) Temporomandibular joint disorders in patients with rheumatoid arthritis. *J Chin Med Assoc* 70: 527-34.
- 5) Bayer N, Kara SA, Keles I, Koc MC, Altinok D and Orkun S (2002) Temporomandibular joint

- involvement in rheumatoid arthritis : a radiological and clinical study. *Cranio* **20** : 105-10.
- 6) 高久 進 (1986) 顎関節疾患, 第1版, 40-3, 書林, 東京.
 - 7) Enokida M, Yamasaki D, Okano T, Hagino H, Morio Y and Teshima R (2001) Bone mass changes of tibial and vertebral bones in young and adult rats with collagen induced arthritis. *Bone* **28** : 87-93.
 - 8) Bendele A, McComb J, Gould T, McAbee T, Sennello G, Chlipala E and Guy M (1999) Animal models of arthritis : relevance to human disease. *Toxicol Pathol* **27** : 134-42.
 - 9) Erlandsson H, Liljestrom M and Klareskog L (1997) Characteristics of synovial fluid effusion in collagen-induced arthritis (CIA) in the DA rat ; a comparison of histology and antibody reactivities in an experimental chronic arthritis model and rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol* **107** : 480-4.
 - 10) Brahn E, Banquerigo ML, Firestein GS, Boyle DL, Salzman AL and Szabo C (1998) Collagen induced arthritis : reversal by mercaptoethylguanidine, a novel antiinflammatory agent with a combined mechanism of action. *J Rheumatol* **25** : 1785-93.
 - 11) Mizumura H, Nishihara S, Kishimoto Y, Morio Y and Teshima R (2004) Tartrate-resistant acid phosphatase-positive cells in the synovial-cartilage junction and bone marrow during the progression of collagen-induced arthritis in adult rats. *Mod Rheumatol* **14** : 123-9.
 - 12) 関根知世子 (2005) 日本臨床, 増刊号, コラーゲン誘発性関節炎 (CIA), 35-9.
 - 13) Cho YG, Cho ML, Min SY and Kim HY (2007) Type II collagen autoimmunity in a mouse model of human rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* **7** : 65-70.
 - 14) Nandakumar KS, Bajtner E, Hill L, Bohm B, Rowley MJ, Burkhardt H and Holmdahl R (2007) Arthritogenic antibodies specific for a major type II collagen triplehelical epitope bind and destabilize cartilage independent of inflammation. *Arthritis Rheum* **58** : 184-96.
 - 15) Gonzalez C, Abello P, Cepeda R, Salazar L, Aravena O, Pesce B, Catalan D and Aguillon JC (2007) Inflammation, synovial angiogenesis and chondroid apoptosis in the evolution of type II collagen-induced arthritis. *Eur Cytokine Netw* **18** : 127-35.
 - 16) Nakamura H, Sato G, Hirata A and Yamamoto T (2004) Immunolocalization of matrix metalloproteinase-13 on bone surface under osteoclast in rat tibia. *Bone* **34** : 48-56.
 - 17) Isikawa T, Nishigaki F, Miyata S, Hirayama Y, Minoura K, Imanishi J, Neya M, Mizutani T, Imamura Y, Ohkubo Y and Mutoh S (2005) Prevention of progressive joint destruction in adjuvant induced arthritis in rats by a novel matrix metalloproteinase inhibitor, FR 217840. *Eur J Pharmacol* **508** : 239-47.
 - 18) Zhao B, Takami M, Miyamoto Y, Suzawa T, Yamada A, Mochizuki A, Yasuhara R, Wang X, Inoue T, Namiki O, Sakamoto K and Kamijyo R (2008) Characterization of synovial cell clones isolated from rheumatoid arthritis patients : Possible involvement of TNF-alpha in reduction of osteoprotegerin in synovium. *Cytokine* **41** : 61-70.
 - 19) Paniagua RT, Sharpe O, Ho PP, Chan SM, Chang A, Higgins J, Tomooka BH, Thomas FM, Song JJ, Goodman SB, Lee DM, Genovese MC, Utz PJ, Steinman L and Robinson WH (2006) Selective tyrosine kinase inhibition by imatinib mesylate for the treatment of autoimmune arthritis. *J Clin Invest* **116** : 2633-42.
 - 20) Nakano K, Okada Y, Saito Y, Tanikawa R, Sawamukai N, Sasaguri Y, Kohro T, Wada Y, Kodama T and Tanaka Y (2007) Rheumatoid synovial endothelial cells produce macrophage colony-stimulating factor leading to osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* **46** : 597-603.
 - 21) 松本歯科大学大学院硬組織研究グループ (2005) 硬組織研究ハンドブック, 第一版, 112-3, 松本歯科大学出版会, 塩尻.
 - 22) Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT and Martin TJ (1999) Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* **20** : 345-57.
 - 23) Udagawa N, Kotake S, Kamatani N, Takahashi N and Suda T (2002) The molecular mechanism of osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* **4** : 281-9.
 - 24) Kreja L, Liedert A, Schmidt C, Claes L and Ignatius A (2007) Influence of receptor activator of nuclear factor (NF)-kappaB ligand (RANKL), macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) and fetal calf serum on human osteoclast formation and activity. *J Mol Histol* **38** : 341-5.
 - 25) Sandler C, Lindstedt KA, Joutsiniemi S, Lap-

palainen J, Juutilainen T, Kolah J Kovanen PT and Eklund KK (2007) Selective activation of mast cells in rheumatoid synovial tissue results in production of TNF-alpha, IL-1beta and IL-1Ra. *Inflamm Res* **56** : 230-9.

26) Haroon N, Aggarwal A, Lawrence A, Agarwal V and Misra R (2007) Impact of rheumatoid arthritis on quality of life. *Mod Rheumatol* **17** : 290-5.