

原 著

Immune complex 関節炎の研究

塚 田 直 敬

信州大学医学部第1病理学教室(主任:河台博正)

STUDIES ON IMMUNE COMPLEX-INDUCED
ARTHRITIS

Naoyuki TSUKADA

Department of Pathology, Faculty of Medicine,
Shinshu University
(Director: Prof. H. KAWAI)

Key words: 抗原抗体結合物 (Immune complex), ライソゾーム (Lysosome)
組織障害 (Tissue injury)

緒 言

最近慢性関節リウマチ (RA) の病因として immune complex の存在が注目されている。それに RA 患者関節液からしばしば封入体を有する細胞が見つかり、その主体は多核白血球 (PMN), macrophage であるとされている。

Hollander¹⁾等は RA の病因として RA cell の存在を報告している。すなわちリウマトイド因子 (RF) と変性または aggregated IgG との結合物 (RF-immune complex) が PMN に貪食されたものと考えている。その結果、PMN の lysosome が関節腔へ放出されて、lysosomal enzyme が活性化し、関節炎を起すというものである。しかしこのような RA cell は RA 以外にパーチェット病、変形性関節症の患者滑液中からも見つかることから²⁾、RA に特異的なものではなく、RA の病因として疑問を持つ人もいる。一方 Hammarman³⁾は結合組織細胞、すなわち滑膜表層細胞の代謝異常という観点から、RA の病因を説明している。最近、RA 組織障害の発現に貪食細胞の lysosomal enzyme の活性が注目されている。Weissmann⁴⁾のいう "final common pathway" は RA の組織障害を説明する上で新しい分野を開いたといえる。しかしこれは endocytosis の結果であって

initiating factor は明確にされておらず、RA の惹起に、lysosome が特異的な役割を演じているとするには、さらに検討すべき問題が残されていると言える。いずれにせよ、RA の病因については依然不明で、複雑多岐にわたっていることが考えられ、今後の研究の発展が待たれる。

著者は RA の病因として考えられている RF-immune complex の関節組織障害機序を研究するためのアプローチとして次の実験をおこなってきた。まずウシ血清アルブミン (BSA) を抗原として、抗 BSA ウサギ抗体を作り、soluble immune complex を作製した。これをウサギ膝関節腔へ注入すると、滑膜炎が発症する⁵⁾。さらに今回 immune complex を繰返し注入することにより、リンパ濾胞、軟骨のパンヌス形成を作った慢性関節炎を発症させ、その滑膜を組織的に観察した。

関節局所における immune complex の組織障害性およびその作用機序についてはほとんど解明されていないといっても過言ではない。

著者は immune complex によって生じたアレルギー性関節病変について検討するとともに、その発症に重要な役割をしていると考えられる PMN、滑膜表層細胞のライソゾーム形態、酵素活性に注目し、immune complex の関節組織障害機序について考察

した。

実験動物および実験方法

1. 実験動物：2.0～3.0kg のウサギを使用した。
2. 抗体および soluble immune complex の作製：抗原として、①フェリチン(cadmium free), ②BSA, ③Egg-albumin (いずれも Nutritional Biochemical corp. Cleveland Ohio) の3者を使用した。なおフェリチンは immune complex の maker である。

それぞれの抗原 25mg に Freund の complete adjuvant を加えて懸濁液を作り、週に1回、合計7回ウサギ背筋および腎筋に注射、感作を行なった。重層法で抗体値が128倍以上に上ったウサギは最後の抗原注射から2週間後に屠殺して血液を採取し、血清を分離して-20°Cに保存した。soluble immune complex は Okumura 等⁶⁾の方法により作製した。

3. soluble immune complex の注入：1mg N/ml の soluble immune complex, 4ml を両側ウサギ膝関節腔へ1回注入した群と4～6回注入した群とを設けた。1回注入群では1, 2, 4, 6, 12時間, 1, 2, 3, 5, 7日の経過で、また4～6回注入群では最後の注入後1週間目に屠殺して関節組織の経時的な観察を行った。

対照としては BSA, 生理食塩水の同量を実験群と同じ方法で注入し、関節組織を観察した。

4. 組織学的観察：屠殺後ウサギ膝関節を切開し、関節組織をとり、燐酸緩衝ホルマリン液で固定後、H. E. および phosphotungstic acid hematoxylin (PTAH) 染色をおこなった。

5. 電子顕微鏡的観察および酸性フォスターゼ (Ac-Pase) 活性：注入1回の実験群について、その滑膜を電子顕微鏡にて経時的に観察するとともに、フェリチンの immune complex および滑膜にみられる Ac-Pase 活性を検索した。

膝関節を屠殺後直ちに開いて滑膜の一部をとり、1.25%グルタルアルデヒド・燐酸緩衝液 (pH 7.2)

で1時間固定した。その後燐酸緩衝液で3回洗浄し、1%オスミウム・燐酸緩衝液 (pH 7.2) にて1時間後固定した。以後アルコール脱水、エボン包埋し、L. K. B. ultratome で薄切、クエン酸鉛、酢酸ウラニールで電子染色し、検鏡した。電子顕微鏡は日立 HU-11A を使用した。

フェリチンの complex を注入した滑膜材料については、フェリチン粒子を見やすくするため、bismuth で染色⁷⁾した後に検鏡した。Ac-Pase 活性の観察にはグルタルアルデヒド固定後下記の Gomori 反応液⁸⁾に 37°C, 30分間反応させた後、上記の一般方法に準じて観察を行った。

Gomori の Ac-Pase 反応液

- 1) 0.1M トリス・マレイン酸緩衝液 (pH 5.0)5ml
- 2) 1.25% β グリセロリン酸ナトリウム5ml
- 3) 0.1% 硝酸鉛 10ml
- 4) 蔗糖 1.8g
- 5) 蒸留水 5ml
(medium pH 6.2)
6. 組織化学的染色：次の2種類の固定方法を用いた。

① 1%の割合でセチルピリジニウム・クロライド (C P C) を含む10%緩衝ホルマリン単独固定⁹⁾。

② 下記の杉山の方法¹⁰⁾により尿素で処置後の C P C ・緩衝ホルマリン固定。

{ 8M urea 3ml
{ 2% C P C ... 1ml 58°C で10時間処置

A Toluidine blue (pH 2.5, 4.1) のメタクロマジー染色。(T B M)。

B pH 2.5 Alcian blue 染色。

C Mowry のコロイド鉄反応。

D 酵素消化試験。streptomyces hyaluronidase (S-Hase), testicular hyaluronidase (T-Hase) および chondroitinase ABC (Ch-ase ABC) の3つの酵素を表1の様な条件にて処

表 1 酵 素 処 理 条 件

| 酵素 | 条件 | 緩 衝 液 | pH | 酵素濃度 | 温度 処置時間 | |
|--------|----|-----------|-----|------|---------|----|
| | | | | | TRU | °C |
| S-Hase | | 燐 酸 緩 衝 液 | 5.0 | 100 | 60 | 6 |
| T-Hase | | 同 上 | 5.0 | 300 | 37 | 6 |
| Ch-ase | | トリス・燐酸緩衝液 | 8.0 | 5 | 37 | 6 |

TRU (Turbidity Reducing Unit)

置後、それぞれ上記の染色を施した。

7. 蛍光抗体染色: Fluorescent anti-rabbit IgG ヤギ血清の作製。抗ウサギγグロブリン、ヤギ血清は感作したヤギのオイグロブリンから作った。Kawamura¹¹⁾の方法に従ってこのγグロブリン分画に fluorescein isothiocyanate (FITC, Baltimore Biological Lab. Baltimore, Maryland) をラベルして、蛍光抗体液を作製した。滑膜を採取後直ちにN-ヘキサンに浸し、ドライアイス・アセトン溶液中にて冷却させた。この組織片をクリオスタット内で4μに薄切し、アセトンで30分間固定した。同時に滑液をとり、塗抹標本にして同様アセトンで固定した。両標本はFITCでラベルした蛍光抗体液と室温で30分間、湿箱内で反応させた。これ等の標本は緩衝グリセリン液で封入し、Nikon 蛍光顕微鏡にて検鏡した。

なお対照として蛍光色素をラベルしてない抗体で処置した後に FITC ラベル抗体液と反応させた。

成績

1. 組織学的検索

(1) Soluble immune complex 注入群

Soluble immune complex を1回注入した滑膜では注入後2時間目頃から滑膜表層下に浮腫および出血がみられる。同時期にはPMNの浸潤がみられるが、1日目頃最も著しく、2日目には滑膜からほとんど消失する(図1)。1~3日目頃にはフィブリノイド膨化が滑膜表層から関節腔へ突出した状態でみられる(図2)。滑膜表層細胞は増生しており、その部分ではときに滑膜表層細胞由来の巨細胞を混じている(図3)。さらに滑膜表層直下には単核細胞を主体として、血管の新生を伴った肉芽腫が形成されている(図4)。滑膜表層下では血管壁の肥厚した毛細血管が多数みられる。3~5日目の滑膜では滑膜表層直下、血管周辺にリンパ球、形質細胞がみられ、ときに滑膜表層下

にリンパ球の集簇が観察される。7日目には軽度の滑膜絨毛の肥大、滑膜表層細胞の部分的増生を残すのみとなる。

immune complex を4~6回注入した滑膜では滑膜の肥厚があり、滑膜表層細胞、線維芽細胞、線維細胞の著しい増生がみられる。その中にはPMNが散在して認められる(図5)。滑膜表層にはときどきPTAH陽性のフィブリノイド変性がみられ、その直下には古い肉芽組織が形成されている(図6)。滑膜表層下では形質細胞を多数混じりリンパ球の集簇がみられ、血管周辺には形質細胞、リンパ球が集簇して観察される(図7, 8)。また滑膜表層下には胚中心のないリンパ濾胞を形成するものがある(図9)。ほとんどの例において軟骨にパンヌス形成がみられ、骨組織の部分的破壊像が観察される(図10)。以上組織所見をまとめてみると表2の如くである。

(2) 対照群

BSA を1回同量を関節腔に注入した場合、注入後8時間目頃から滑膜に軽度のPMN浸潤がみられる。滑膜に増生性の病変はみられない。生食注入群では滑膜に病変は認められない。

BAS を4回注入した滑膜は、滑膜表層細胞が増生し、滑膜下表層血管周辺にときどきリンパ球の出現がある。

2. 蛍光抗体による染色所見

滑液のPMN, macrophage 様細胞は注入後6時間目頃より細胞質に特異蛍光が陽性であり、1日目には特に蛍光陽性の著しいPMNが多数みられる(図11)。2日目以降蛍光陽性PMNは著しく減少する。滑膜PMNもほぼ同様な所見である。滑膜表層では注入後8時間目頃まで蛍光陽性物質が層状に沈着しているのが観察できる。滑膜表層細胞は12時間目頃から蛍光陽性となり、5日目頃まで持続する(図12)。滑膜基質は滑膜表層細胞の増生の始まる1日目頃蛍光陽性物質

表2 組織学的所見

| 経過 | 注入回数 | 関節数 | PMN | 滑膜表層細胞の増生 | パンヌス | 濾胞リンパ |
|--------|------|-----|-----|-----------|------|-------|
| 1~24時間 | 1 | 40 | 40 | 24 | 0 | 0 |
| 1~3日 | 1 | 36 | 26 | 36 | 0 | 0 |
| 3~5日 | 1 | 18 | 4 | 18 | 0 | 0 |
| 5~7日 | 1 | 18 | 0 | 14 | 0 | 0 |
| | 4 | 8 | 8 | 8 | 7 | 6 |
| | 6 | 8 | 8 | 8 | 8 | 6 |

の沈着があり、5日目頃まで認められる。脂肪細胞周辺は注入後12時間目頃より蛍光陽性で、7日目以降、長期間 immune complex を取り込んでいる所見である。

3. 電顕所見 (表3)

ウサギ滑膜表層細胞は人における Barland¹²⁾の分類と同様に Type A, B cell およびその移行型の3種類に分類される¹³⁾。

(1) Soluble ferritin-antiferritin complex 注入群

Type A cell: フェリチンの immune precipitate は0.8~3.0 μ 大の phagosome 内に取り込まれている。このような phagosome は electron dense な顆粒と隔合しているものが多い (図13)。

注入後1~3日目にはこれ等 phagosome は限界膜がほとんど消失して、immune precipitate が細胞基質に遊離しているものが多く、その周辺の基質は破壊され、organella が変形している (図14)。さらに細胞が破壊されて、顆粒およびフェリチンの immune precipitate が細胞外へ放出されているものがときどきみられる (図15)。その他限界膜内に膜様構造、dense body, vesicle を含む cytosegresome が細胞内に多数認められる (図16)。ときにフェリチンの immune precipitate を持った phagosome がその中に観察されることがある。

Type B cell: 注入後1~12時間目頃まではフェリ

チンの immune precipitate は余りみとめられないが、1~3日目頃に phagosome, 二次ライソゾーム周辺の細胞基質に存在する。ときに phagosome 内に集簇して観察される。

PMN: フェリチンの immune complex は phagosome および phagolysosome 内にみられる (図17)。二次ライソゾームは増加しているが Type A cell に比べてその数は少ない。

(2) Soluble BSA-anti BSA complex 注入群

Type A cell: 注入後2時間目頃より pinocytic vesicle が認められる。4時間目頃には filopodia が発達し始め、多数の phagosome が形成されている。注入後1~3日目には0.8~3.0 μ 大の phagosome が著しく増加し、その中には density の均等な無構造物質および40~50Åの electron dense な粒子が混在している。これ等 vacuole 様構造は膜が消失しているものが多く、核に近い程その傾向が著しい。phagosome 周辺には electron dense な顆粒が集まっていることが多い。ときに phagosome が顆粒と隔合し phagolysosome を形成している。この他種々の形態を持った lysosome が増加している。限界膜内にミトコンドリア, vesicle を含んだ autophagosome (図18), 限界膜内に膜様構造, vesicle, dense body を持つ residual body が観察される (図19)。Type A cell にはフィブリン, PMN, 赤血球を貪食した滑

表 3 滑膜表層細胞の電顕所見
Type A cell

| 経 過 | 2 | 4 | 6 | 12時間 | 1 | 2 | 3 | 5 | 7日 |
|--------------------|---|---|---|------|---|----|----|---|----|
| 膨 化 | | | | | + | + | + | | |
| 萎 縮 | | | | | + | + | + | | |
| 二次ライソゾーム | | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Phagosome | | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Ac-Pase activation | | | | | + | ++ | ++ | + | |

Type B cell

| 経 過 | 2 | 4 | 6 | 12時間 | 1 | 2 | 3 | 5 | 7日 |
|-------------------|---|---|---|------|---|---|---|---|----|
| 細胞増生 | | | | | + | + | + | + | |
| rER の増生 | + | + | + | + | + | + | + | + | |
| rER の拡張 | | + | + | + | + | + | + | + | |
| ミトコンドリアの膨化 | | | + | + | + | + | + | + | |
| ライソゾーム | | | | | + | + | + | + | |
| Pinocytic vesicle | | | | | | + | + | + | |



図 1 滑膜のPMN浸潤。(soluble BSA-anti BSA complex 1回注入) ×400

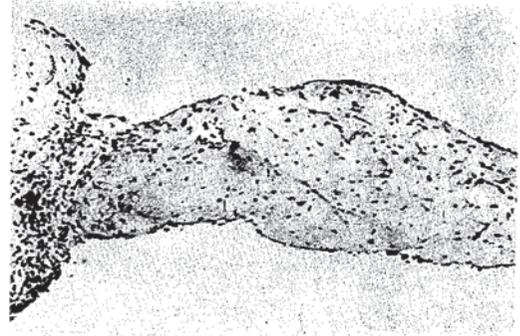


図 2 滑膜表層から関節腔へ突出したフィブリノイド膨化部。(soluble BSA-anti BSA complex 1回注入) ×100



図 3 滑膜表層細胞の増生および巨細胞形成。(soluble BSA-anti BSA complex 1回注入) ×400

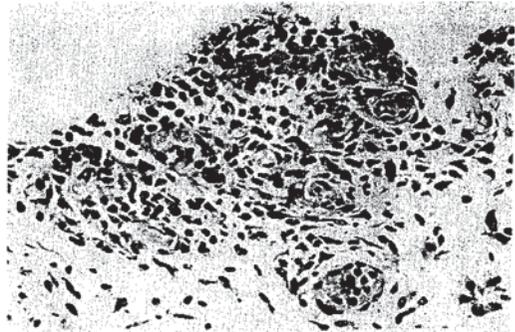


図 4 血管新生を伴った肉芽腫。(soluble BSA-anti BSA complex 1回注入) ×400

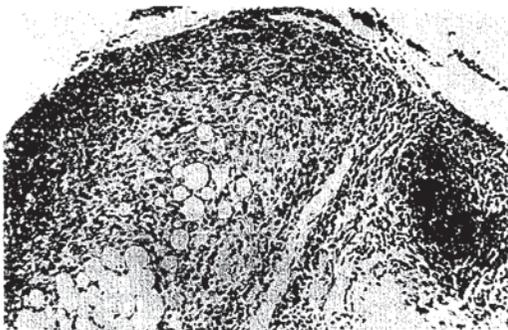


図 5 滑膜表層細胞の著しい増生と滑膜表層下にみられたリンパ濾胞。(soluble BSA-anti BSA complex 4回注入) ×100

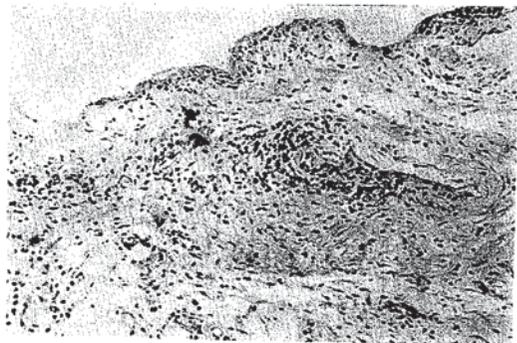


図 6 滑膜表層下の古い肉芽組織形成、滑膜表層にはフィブリノイド変性がみられる。(soluble BSA-anti BSA complex 6回注入) ×100

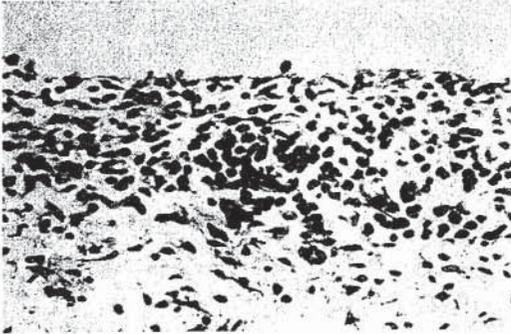


図7 滑膜表層付近にみられるリンパ球の集簇。
(soluble BSA-anti BSA complex 4回注入)
×250

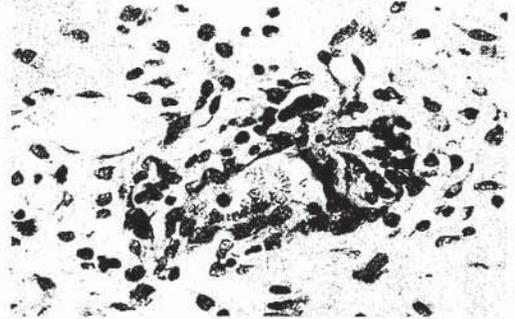


図8 滑膜表層下の血管周辺にみられたリンパ球、
形質細胞の集簇。(soluble BSA-anti BSA
complex 4回注入) ×400

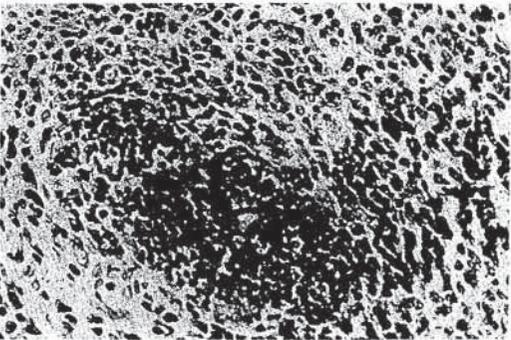


図9 滑膜表層下に認められた胚中心のないリンパ
濾胞、濾胞の中には血管がみられる。(soluble
BSA-anti BSA complex 4回注入) ×250

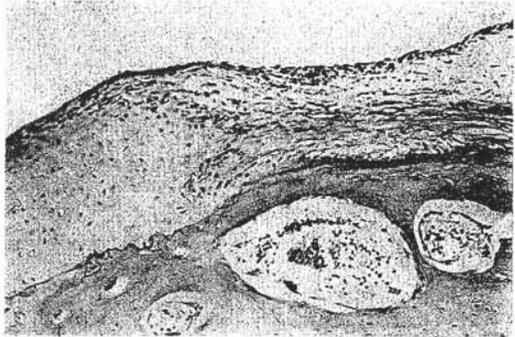


図10 軟骨にみられたパネマス形成および骨の破
壊。(soluble BAS-anti BSA complex 4回
注入) ×100

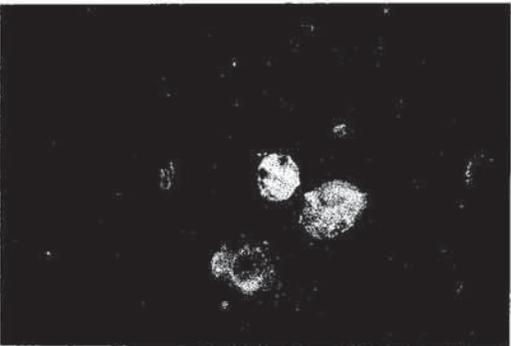


図11 ウサギ IgG 蛍光陽性の滑液 PMN, macro-
phage 様細胞。(soluble BSA-anti BSA com-
plex 1回注入) ×400

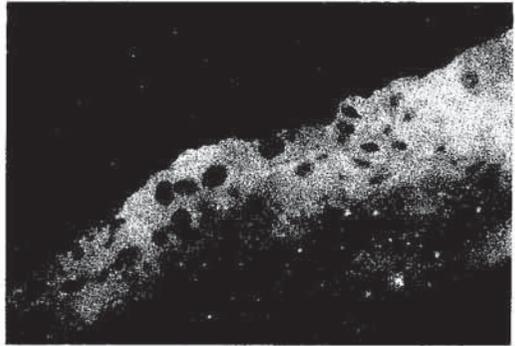


図12 ウサギ IgG 蛍光陽性滑膜表層細胞。(soluble
BSA-anti BSA complex 1回注入) ×400

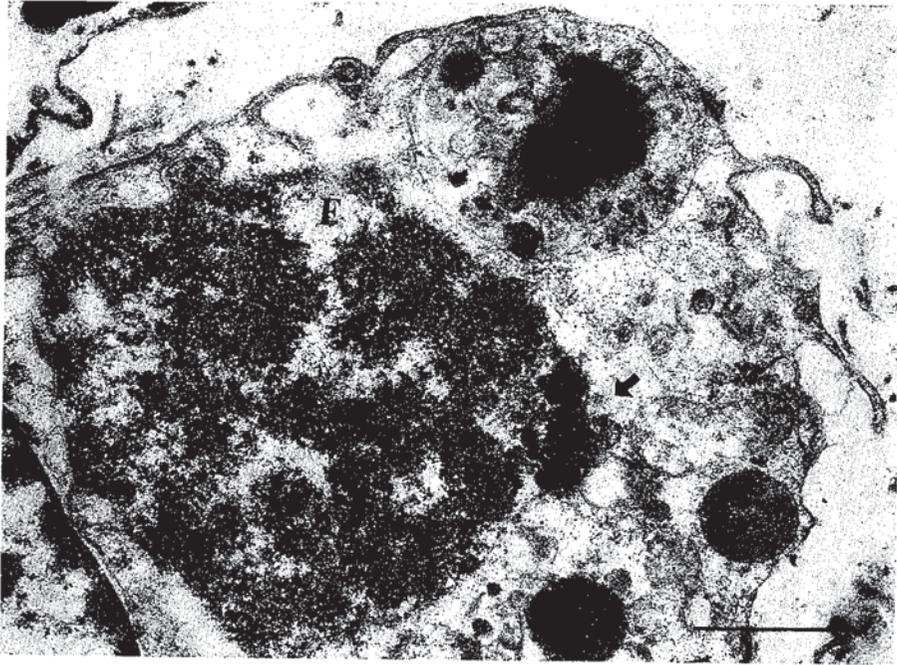


図13 Type A cell 細胞における ferritin の immune precipitate (F), 一次ライソゾームの phagosome との融合 (矢印)。(ferritin complex) ×28,800

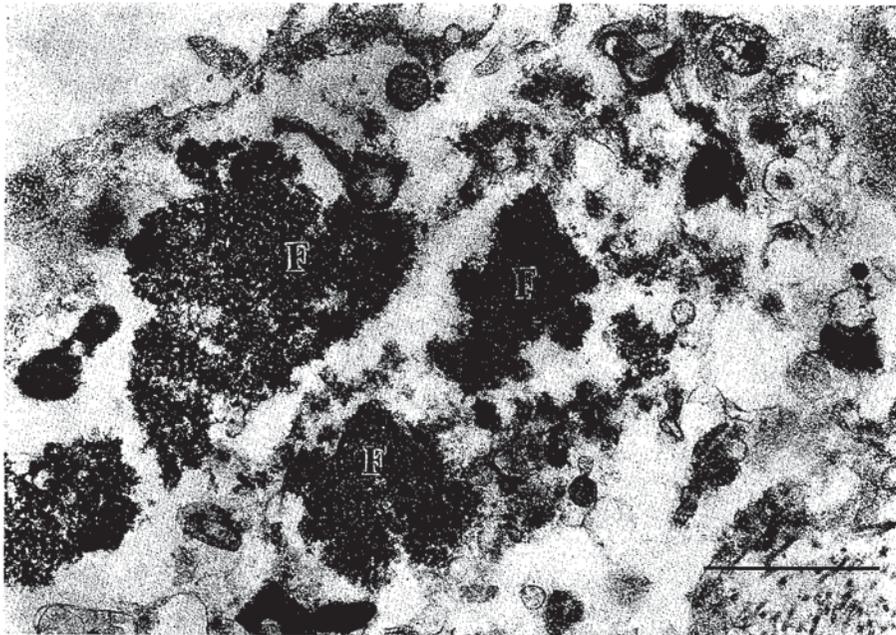


図14 ferritin の immune precipitate (F) の基質への放出。その周辺の organella は変形している。(Type A cell) (ferritin complex) ×28,800

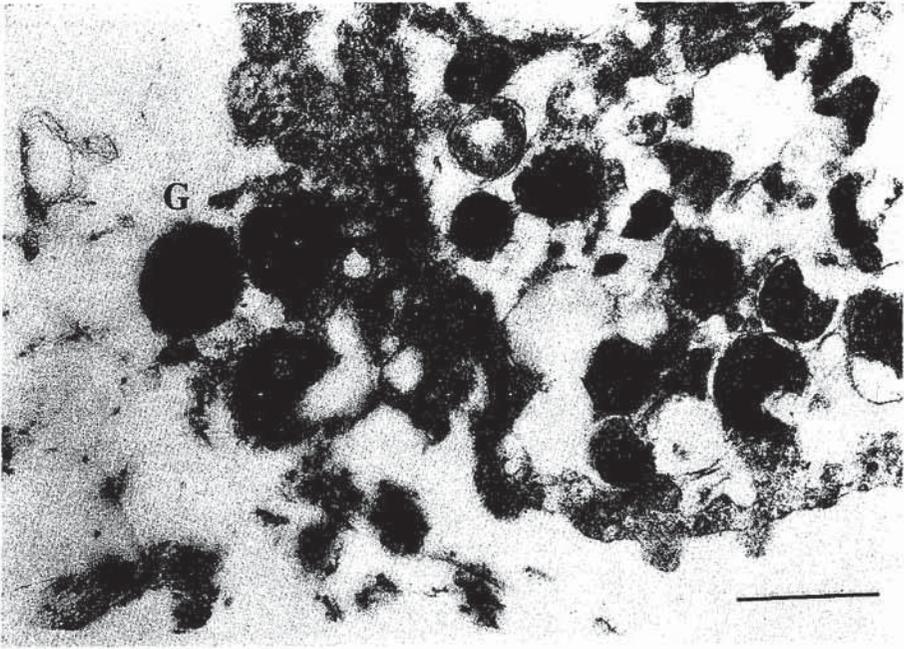


図15 Type A cell における脱顆粒 (G) および ferritin (F) immune precipitate の細胞外放出。(ferritin complex) ×24,000

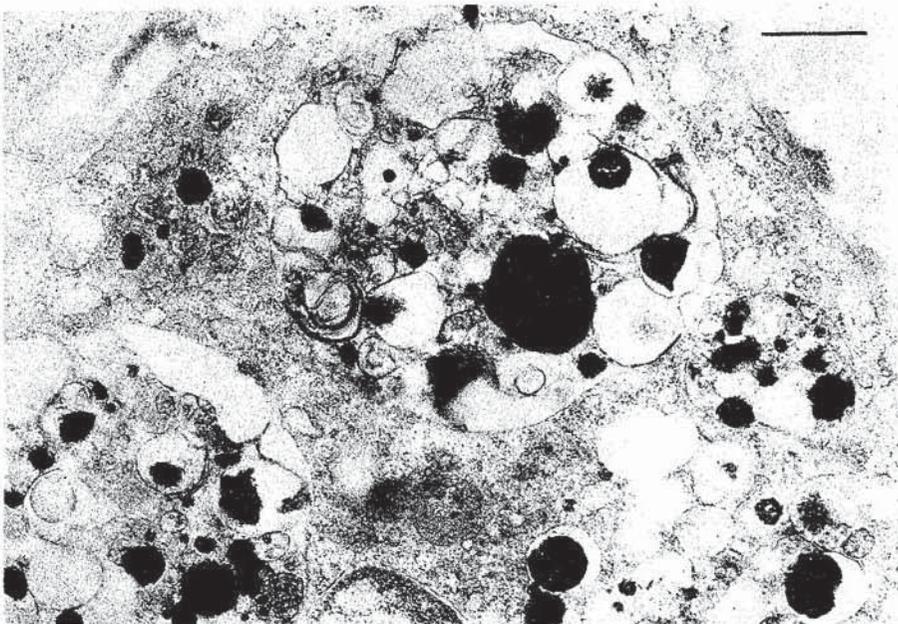


図16 Type A cell にみられた多数の cytosegresome。(ferritin complex) ×18,000

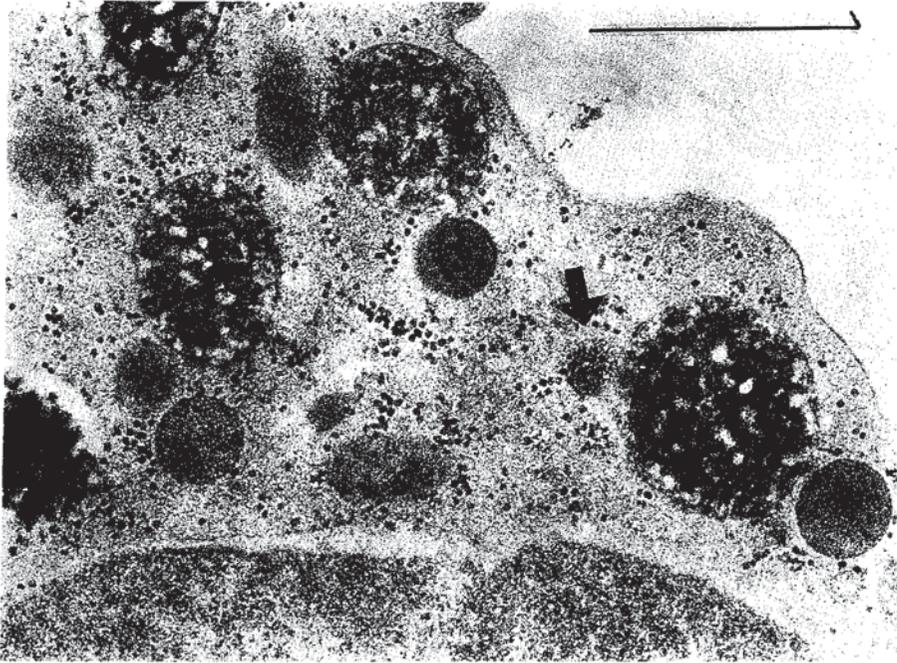


図17 PMNに取り込まれた immune precipitate (矢印) および immune precipitate を含んだ二次ライソゾームの増加。(ferritin complex) $\times 48,000$



図18 Type A cell にみられた autophagosome (A)。(BSA complex) $\times 48,000$

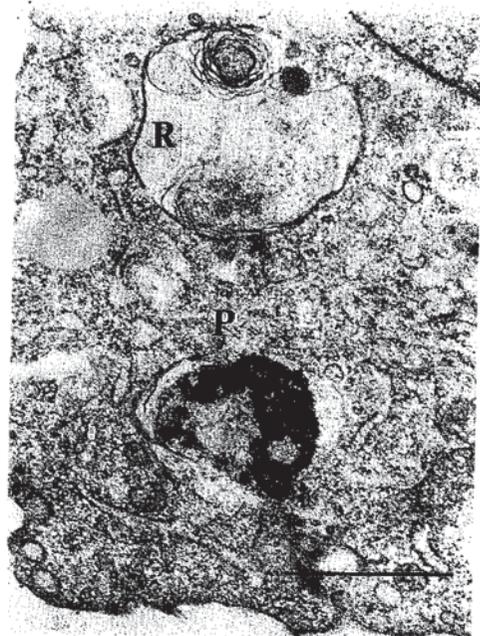


図19 Type A cell にみられた residual body (R) と phagolysosome (P)。(BSA complex) $\times 28,800$

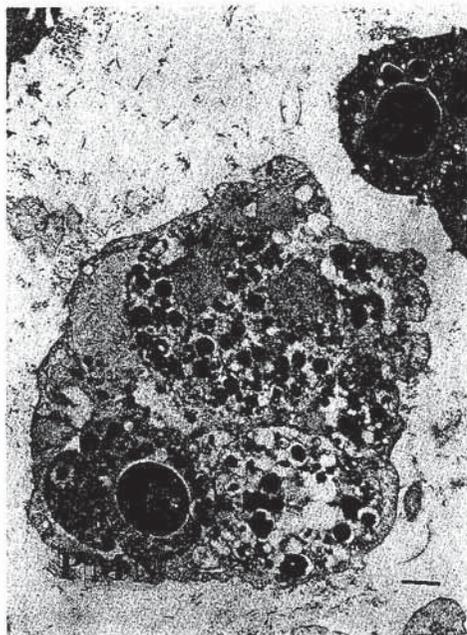


図20 滑膜表層細胞のPMN 貪食像。(BSA complex) $\times 6,000$

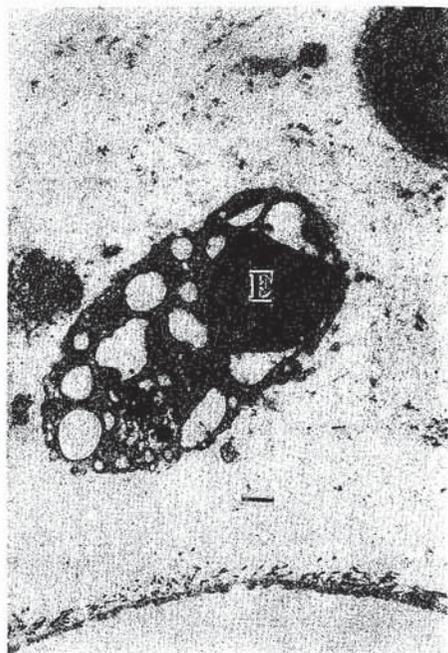


図21 滑膜表層細胞の赤血球 (E) 貪食像。(BSA complex) $\times 4,800$

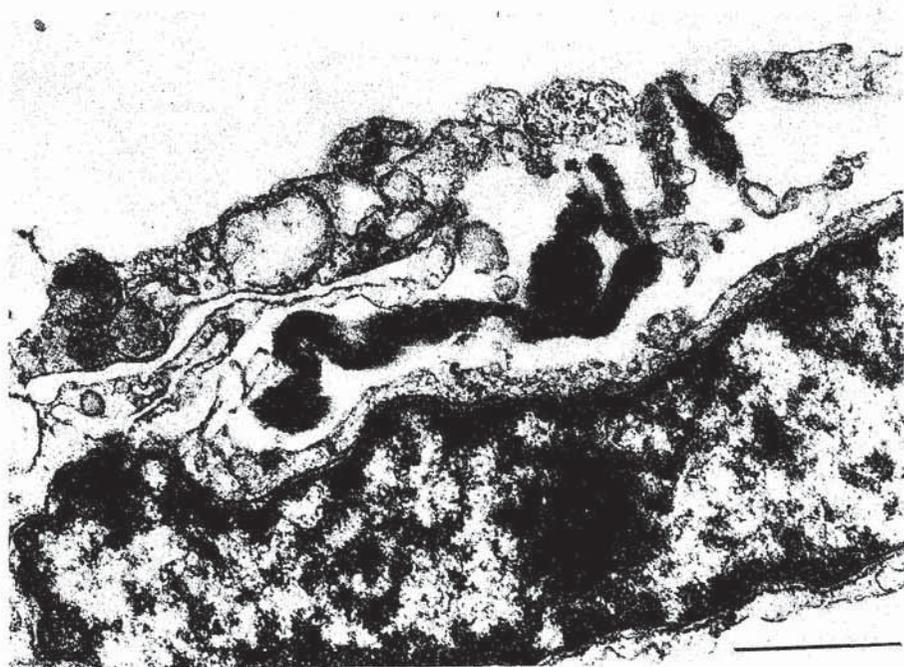


図22 Type A cell にみられたフィブリンの取り込み。(BSA complex) $\times 28,800$

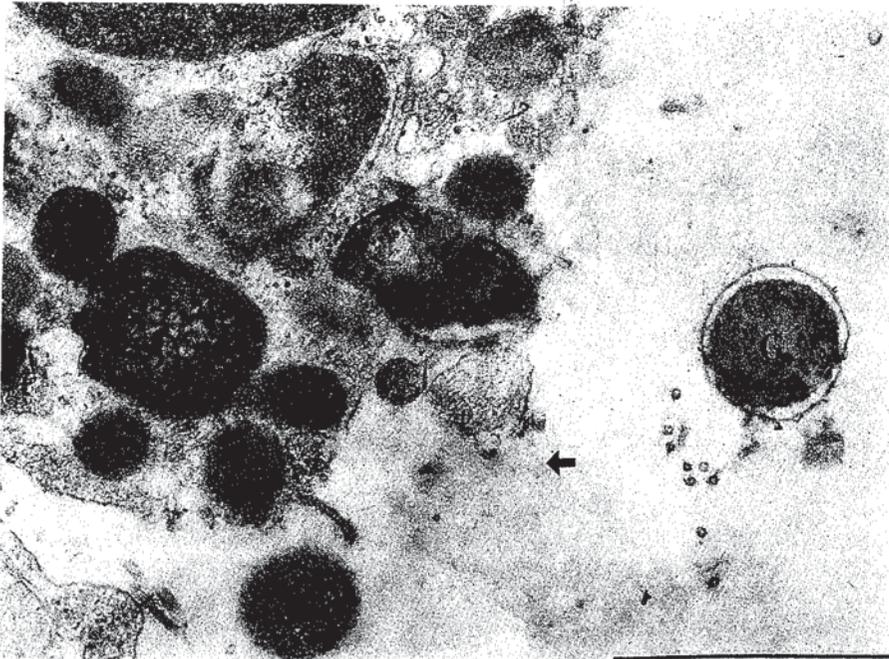


図23 PMN の脱顆粒 (G) および顆粒の破壊像 (矢印)。(BSA complex) $\times 48,000$

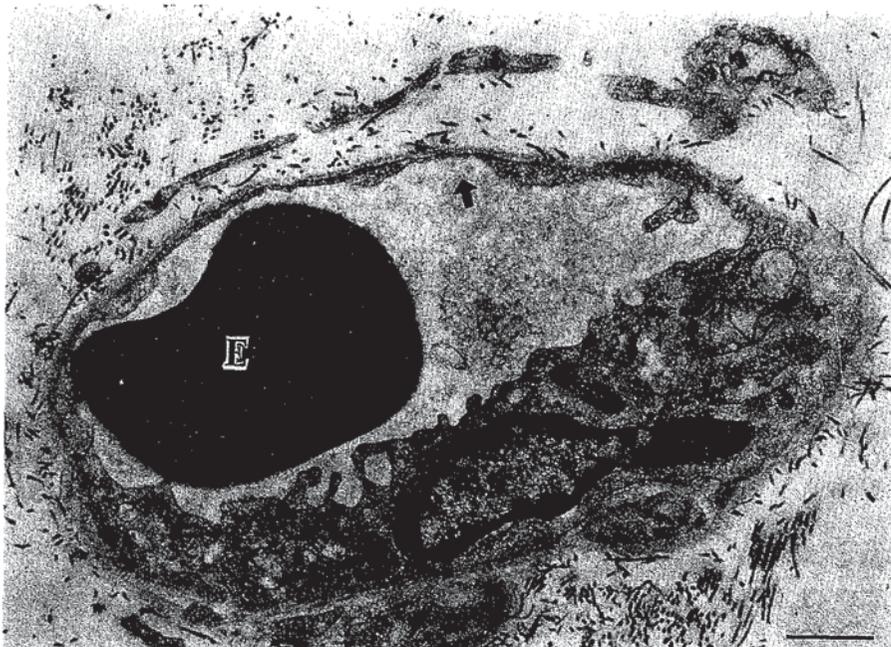


図24 滑膜表層の毛細血管内皮細胞には vacuole, pinocytic vesicle がみられ, fenestration の開大が目立つ (矢印)。管腔には赤血球 (E) がみられる。(BSA complex) $\times 14,400$

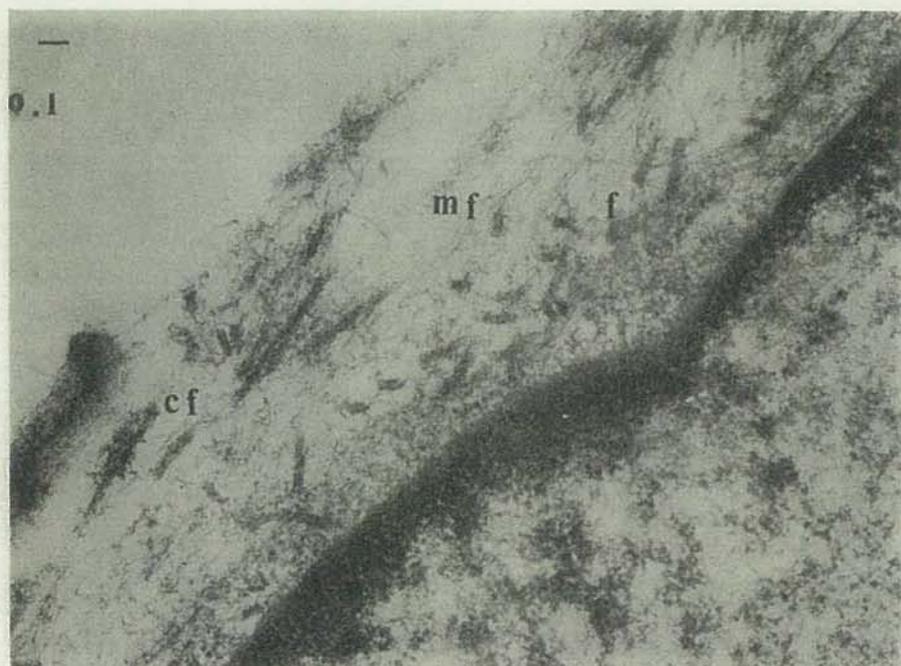


図25 Type B cell 周辺の滑膜基質には microfibril (mf), collagen fibrils (cf), microfilament (f) の増生がみられる。(BSA complex) ×48,000

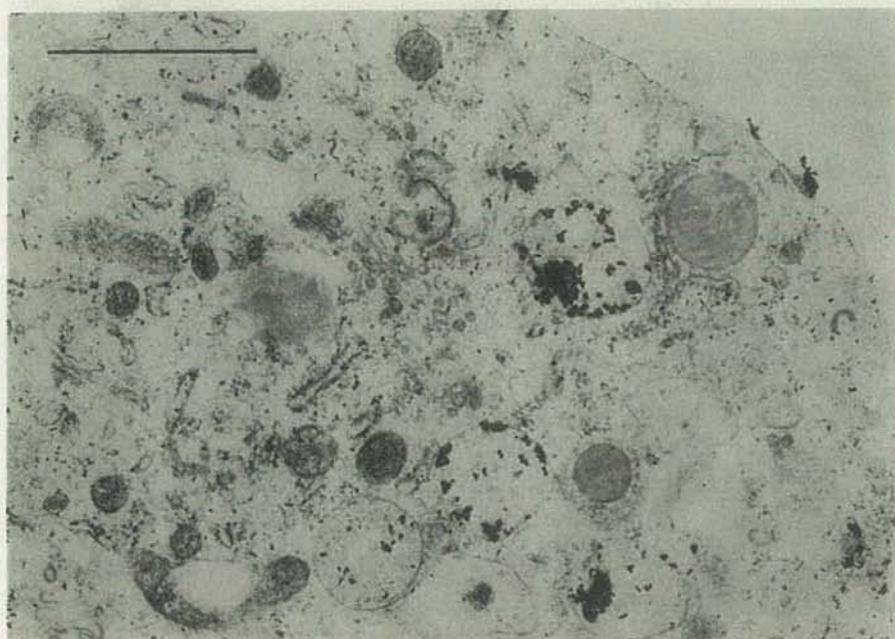


図26 Type A cell は Ac-Pase 活性を持った二次ライソゾームの増加を示す。(BSA complex) ×36,000

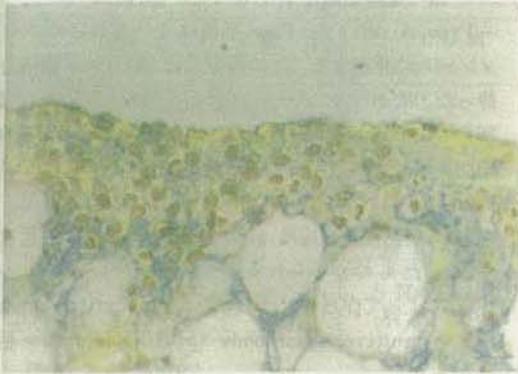


図27 CPC・ホルマリン固定後のMowryのコロイド鉄反応。滑膜基質 AMPS が弱陽性である。×400



図28 8M urea 処置後のCPC・ホルマリン固定材料：滑膜基質（Type B cell 周辺）AMPS は強陽性である。Mowry のコロイド鉄反応。×400

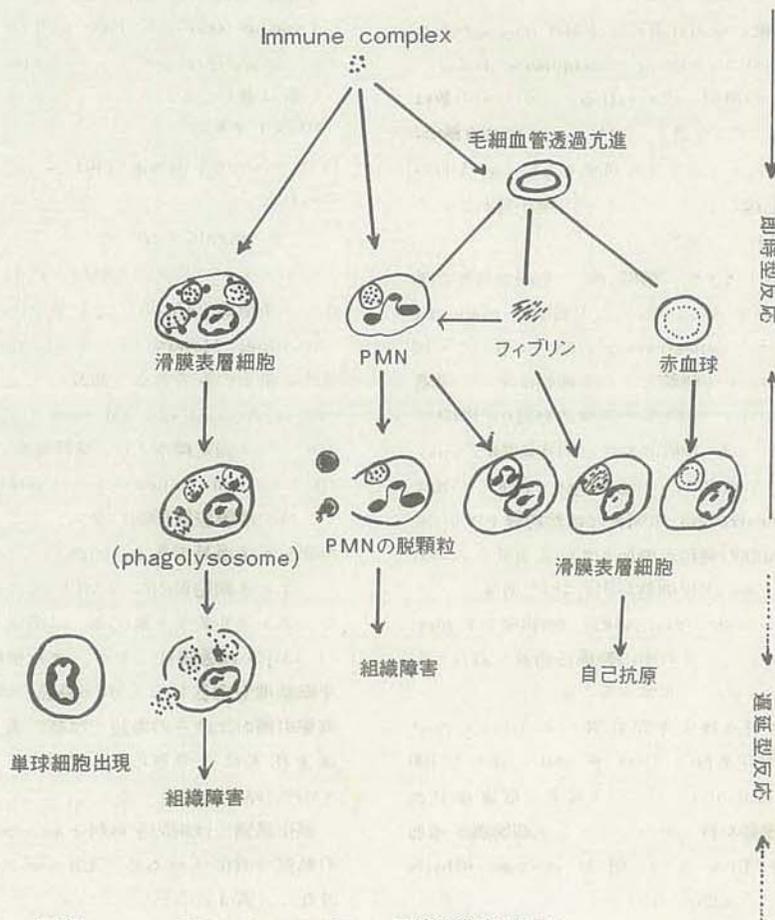


図29 Immune complex の関節組織障害機序

膜表層細胞がしばしばみられる(図20, 21, 22)。

特に PMN, 赤血球を貪食した細胞内には同時に cytosegresome が観察される。

この時期にはミトコンドリアの膨化, crista の消失, 滑面小胞体の拡張がみられる。

Type B cell: 注入後1~3日目頃より滑膜表層細胞の増生があるが, これはほとんど Type は B cell の増生によるものである。粗面小胞体は注入後2時間目頃から増生し始め, 特に1~3日目頃に著しい増生を示す。同時に cisterna の拡張を伴っており, その中に網状あるいは無構造物質を容れている。ときどき cisterna が嚢胞状に拡張している細胞がみられる。ミトコンドリアは膨化しているものが多く, crista が変形あるいは消失しているものがある。二次ライソゾームは増加している。organelle が完全に消失し, 細胞基質がみられない細胞がある。

PMN: 注入後2時間目頃より PMN がよくみられる。胞体内には0.5~1.0 μ 大の phagosome および二次ライソゾームの増加が認められる。しかしその数は Type A cell に比べて著しく少ない。また同時期に, PMN が析出したフィブリンを貪食している。1日目頃には脱顆粒を起し, ライソゾーム膜が破れている PMN が観察される(図23)。

毛細血管: 注入後1~12時間目には毛細血管腔が拡張しているものが多い。血管内皮細胞は pinocytic vesicle が目立つ。fenestration の開大が著しく(図24), cell junction が解離している細胞がある。基底膜周辺には density の均等な無構造物質が円周状に沈着している。12~18時間目では内皮細胞に pinocytic vesicle が目立ち, 粗面小胞体(rER)が増生している。fenestration の開大は依然持続している。ときどき内皮細胞の突起が増加している血管がみられる。1~5日目頃に内皮細胞が円心状に増生しており, 細胞が2~3層になっている。胞体内には phagosome が増加して, その中に無構造物質を容れている。毛細管 pericyte は増加している。

細胞間基質: 注入後4時間目頃から5日目にかけて, 滑膜の細胞間基質は Type B cell に接して100~150Å の microfibril, 50~80Å 程度の細線維状あるいは顆粒状構造を持ったフィラメント様物質が増加している。また Type B cell 周辺の collagen fibrils も増加している(図25)。

4. 電顕組織化学(Ac-Pase 活性)

Type A cell: Ac-Pase 活性は1~3日目のライソゾームに存在する。この時期には Ac-Pase 活性を持った二次ライソゾームが著しく増加している(図26)。Ac-Pase 活性を持った二次ライソゾーム周辺の細胞基質が破壊されている細胞が多い。その他 Ac-Pase 活性はゴルジ小胞, 粗面小胞体に認められる。Ac-Pase 活性を持った pinocytic vesicle は相互に隔合したものがみられる。filopodia の invagination によって作られた vacuole, pinocytic vesicle 由来の multivesicular body (MVB) に Ac-Pase 活性がある。

0.8~3.0 μ 大のフェリチンの immune precipitate を含んだ phagosome は大部分 Ac-Pase 活性を持っているが, 2.0 μ 以上の比較的大きな phagosome はときどき Ac-Pase 活性がない。

Type B cell: Ac-Pase 活性は一次, 二次ライソゾームに認められる。しかし Type A cell に比べてその数は著しく少ない。

PMN: まれに二次ライソゾームに Ac-Pase 活性を持つ。electron dense な顆粒は Ac-Pase 活性がみとめられない。

5. 組織化学的所見

CPC・ホルマリン固定材料の標本で, 滑膜基質の酸性ムコ多糖類(AMPS)は T B M 弱陽, pH 2.5 Alcian blue, Mowry のコロイド鉄反応はいずれも弱陽性に染るのみである(図27)。

杉山の方法によって 8M urea で処置した後の CPC・ホルマリン固定標本では, 滑膜基質 AMPS は T B M, pH 2.5 Alcian blue, コロイド鉄反応はいずれも陽性で, 特に滑膜表層細胞の増生している部分では, その増加を示す所見である(図28)。いずれの固定標本でもときどき細胞質内に AMPS 陽性を呈するものがある。フィブリノイド膨化部では滑膜基質および細胞質内 AMPS は強陽性である。また滑膜表層下では線維芽細胞増生とともに AMP S染色の陽性度が強くなり, 肉芽組織およびその周辺では特に著しい。しかし4回以上注入により見られるフィブリノイド変性部では AMPS 陰性の所見であった。

消化試験では両固定材料ともに S-Hase, T-Hase, の処置で消化されるが, Ch-ase ABC では影響を受けない(表4, 5)。

表 4 滑膜基質の酸性ムコ多糖 (AMPS)

| AMPS | 染色 | T B M pH 4.1 | T B M pH 2.5 | pH 2.5 アルシアン青 | コロイド鉄 |
|----------------------|----|-----------------|-----------------|------------------|-------|
| CPC・ホルマリン固定 | | + | - | +↑ | +↓ |
| 8M urea, CPC・ホルマリン固定 | | + | - | ++ | ++ |

(↑↓は弱陽性)

表 5 滑膜基質 AMPS 消化試験

| AMPS | 染色 | S-Hase 処置 pH 4.1 TBM | S-Hase 処置 アルシアン青 | T-Hase 処置 アルシアン青 | Ch-ase ABC 処置 アルシアン青 |
|-----------|----|-------------------------|---------------------|---------------------|-------------------------|
| 滑膜基質 AMPS | | - | - | - | + |

考 察

Soluble immune complex の生物学的活性

Soluble immune complex の生物学的活性についてはすでにアナフィラキシーショック¹⁴⁾¹⁵⁾, 皮膚血管透過亢進¹⁶⁾¹⁷⁾, 血清病¹⁸⁾¹⁹⁾などを起すことが知られている。

aggregated IgG²⁰⁾および尿素変性 IgG²¹⁾は soluble immune complex と同様な生物学的活性を持ち, それは IgG の Fc 部分が相互に interaction を起したためとされている。soluble immune complex は IgG 抗体の Fc 部分に aggregated IgG と同様な変化が起っていると考えられている²²⁾²³⁾。このことから IgG complex の生物学的活性は抗体側 Fc 部分によって決定され, いずれの IgG complex でも, 抗体 IgG と特異的に抗原抗体結合を起すものはすべて同じ生物学的活性を持つことになる。

我々は抗原にフェリチン, BSA, 卵白アルブミンを使用した, いずれの immune complex でも同様な関節病変を起して行くことがわかった。多分それ以外の抗原を用いても, IgG complex であるならば同様の病変を起すものと考えられる。

RA 患者血清中にみられる RF は変性ヒト IgG に対する抗体と言われており, 関節腔で IgG-RF (IgM, IgG) 結合物を作る。IgM 抗体の生物学的活性についてはいまだ明確にされていない点が多い。IgM 抗体が immune complex の型²⁴⁾, あるいはは aggregate されたものは皮膚 Arthus 現象を起すと報告されており, また soluble IgM complex による微少循環の変化は soluble IgG complex とほぼ同様な滲出性, 増殖性反応を起すと言われている²⁵⁾。この

ことから RA 患者関節腔で作られる RF-immune complex は IgG complex とほぼ同様な生物学的活性を持つことが充分考えられる。

Soluble immune complex の取り込み

Soluble immune complex を関節腔へ注入した場合, はたして immune complex が結合物としてそのままの状態では活性を示すのか, あるいは抗原と抗体が一度分離してから再び結合するのかが問題となる。

Soluble BSA complex を in vitro で作製し, 超遠心分析をおこなった結果では, 3.2S, 9S, 12S それ以上の heterogeneous な成分からなり, free の IgG は認められないようである²⁶⁾。最近 Hollister²⁷⁾はウサギ膝関節で, immune complex の動態を経時的に観察しているが, 関節腔の 11S 以上の immune complex は血液循環内の complex²⁸⁾に比べて長期間, その結合状態のまま関節腔に局在することがわかった。

著者の実験において, 蛍光抗体法による immune complex の取り込みは 1 日目頃まで滑液中 PMN, macrophage 様細胞は蛍光陽性である。滑膜表層細胞は 1~5 日目頃まで蛍光陽性であり, この時期は滑膜組織障害の著しい時期と一致する。滑膜を電顕的に観察してみると, Type A cell では 0.8~3.0 μ 大の phagosome 内にフェリチンの immune precipitate が取り込まれている。Type B cell, PMN でも同様に phagosome に取り込まれているが, その数は Type A cell に比べて著しく少ないのが特徴的である。

貪食細胞のライソゾームとその活性

一層の限界膜に囲まれ, 加水分解酵素を含む細胞内小体はライソゾームと呼ばれる²⁹⁾。

注入後 1~3 日目 Type A cell にみられる 0.8 μ 大以上の vacuole 様構造はその中に immune pre-

cipite を含む phagosome である。この phagosome は大部分 Ac-Pase 活性を持つが、比較的大きな phagosome は Ac-Pase 活性陰性のものがある。食食のおこなわれた初期の phagosome は Ac-Pase 活性陰性であるが、一次ライソゾームと隔合し、phago-lysosome となって、Ac-Pase 活性を持つことになる。Ac-Pase 活性を持った一次ライソゾームは対照群においてときどきみられるが、この基質は均等で、Ac-Pase 活性部位は lysosome 内に瀰漫性に存在するのが特徴的である。ここでみられる phagolysosome の Ac-Pase 活性局在は限界膜の周辺か、あるいは一部分に偏在して認められるものが圧倒的に多い。

この他 autophagosome (autophagic vacuole), およびミエリン様構造を持った residual body³⁰⁾³¹⁾がみられる。RA 患者の滑膜表層細胞で autophagosome, residual body, lysosome 由来のミエリン構造がしばしば観察される³²⁾³³⁾³⁴⁾、これ等は RA 患者の滑膜表層細胞に特異的なものではない。autophagosome は細胞質内の局所的自己隔解ないしは変性、細胞質内異化作用と密接に関係しているといわれ³⁵⁾、人正常滑膜ではほとんど見られないようである¹²⁾。

residual body は phagolysosome, autolysosome の最終産物と考えられており、postlysosome³⁶⁾に分類される。滑膜表層細胞にみられる二次ライソゾーム、residual body, autophagosome, lysosome 由来のミエリン様構造の増加は急速なライソゾーム活性の促進を意味するもので、これ等は一次ライソゾームに比べてこわれやすいと言われている³³⁾³⁷⁾。このように滑膜表層細胞は種々の形態を持ったライソゾームが増加する以外に、RA にみられるようなフィブリン³⁴⁾、PMN³⁸⁾、赤血球の貪食が観察される。これ等はいずれも貪食されて、ライソゾームを形成することになる。PMN は貪食されて heterophagic cytotegresome³⁹⁾、赤血球は siderosome⁴⁰⁾ を作る可能性がある。滑膜表層細胞の erythrophagocytosis は注入初期にみられる出血の結果起ったものと考えられる。

関節炎における組織障害性

実験的関節炎における組織障害の発現に lysosomal enzyme の遊離、活性化が重要視されている⁴¹⁾⁴²⁾⁴³⁾⁴⁴⁾⁴⁵⁾⁴⁶⁾。

Streptolysin S はライソゾームの膜阻害因子⁴⁷⁾として知られているが、これをウサギ膝関節腔へ繰返し注入すると、RA に類似した慢性関節炎が発症することが報告されている⁴⁸⁾。Weissmann⁴⁹⁾は、貪食細胞

内の lysosome (autolysosome 等) の分解産物、滑膜表層細胞内の lysosomal enzyme による変性物質が自己抗原性をもち、自己抗体が作られると考えている。lysosomal enzyme の活性、遊離により惹起される慢性関節炎⁴⁶⁾、その他の結合織病の組織障害を自己抗体が関与したアレルギー性機序で説明しようとしている。

RA の組織障害の発現に lysosomal enzyme の役割を重要視する報告は数多い⁵⁰⁾⁵¹⁾⁵²⁾。lysosomal enzyme の遊離、活性化によるアレルギー性機構の関与は RA 等の結合織疾患の発現に関連して、感染アレルギーの遅延型反応の解明に重要な示唆を与えているといえる。しかし RA の病因としてはさらに検討すべき問題が残されている。

Coombs⁵³⁾⁵⁴⁾等はアレルギー性組織障害を I~IV 型に分類している。その III 型は immune complex lesion に該当するもので、この組織障害としては immune complex が PMN の phagosome に取り込まれ、PMN が脱顆粒を起し、lysosomal enzyme を放出するためと考えられている⁵⁵⁾⁵⁶⁾⁵⁷⁾。肺、関節 Arthus 現象では immune complex は PMN、血小板に認められ、PMN、血小板の脱顆粒がおこって、chemical mediator の放出につながると言われている⁵⁸⁾⁵⁹⁾。in vitro でも PMN を immune complex とともに培養すると、immune precipitate が PMN に貪食されて、脱顆粒が起り、多量の酵素が放出されることが知られている⁶⁰⁾⁶¹⁾⁶²⁾。以上のことから immune complex の組織障害機序⁶³⁾としては、補体をとった immune complex が PMN に取り込まれて、ライソゾームの活性化、PMN の脱顆粒が起り、chemical mediator が遊出されて組織障害が起ることが推測される。

Arthus 型の関節炎は antigen-induced arthritis⁶⁴⁾として知られており、即時型反応⁵⁹⁾にとどまらず遅延型反応⁶⁵⁾⁶⁶⁾、さらに慢性関節炎⁶⁷⁾を起すものまでさまざまである。この反応の相違は関節のもつ臓器特異性の他に、抗原の種類、量、感作動物の抗体価、抗原抗体結合の結合比に関係していることが推測される。

Dumond および Glynn⁶⁸⁾はこの様な関節炎の発症機序としてアレルギー性反応の関与と自己免疫反応の出現を考えている。

関節内 immune complex がいかなる機序で組織障害を起すかという問題についてはほとんど解明されていないといっても過言ではない。著者は組織、電顕、酵素化学により、経時的に関節組織を観察し、図29の

様な組織障害に至る経路を考えた。

immune complex 注入初期ではフィブリンの析出、出血、PMN の浸潤がみられることから、immune complex は関節微少循環に作用し、循環障害すなわち滲出性病変を起させている。これは関節 Arthus 現象の即時型反応に一致するものであるが、その作用機序についてはまだ未解決の問題が残されている。フィブリノイド膨化は炎症性滲出現象より遅れて出現するが、これは循環障害の程度の差によって即時型反応の過程でみられるものと解釈できる。注入後1日目頃にPMNの脱顆粒がみられるが、これはimmune complexによる即時型のアレルギー性組織障害の発現に重要な役割をしていると考えられる。

注入後1～3日目にみられる滑膜表層細胞の増生、滑膜表層細胞由来の巨細胞の出現、単核細胞を主体とする血管新生を伴った肉芽腫は遅延型反応の惹起を示す所見である。この組織反応の発現にはimmune complexや炎症性滲出物の貪食に加えてArthus様現象でみられたフィブリノイド膨化の器質化が関与しているものと考えられた。従ってimmune complexによる組織障害には、変質、滲出および増殖などの炎症性組織像を伴っており、特に即時型反応から遅延型反応まで一連のアレルギー性病変が起っているものと理解した。

注入後1～3日目の滑膜組織障害の著しい時期においてimmune complexは滑膜表層細胞のphagosome内に観察される。immune precipitateを含むphagosomeはほとんど膜が消失しており、immune precipitateが基質に放出され、その周辺基質が破壊されていることから、immune precipitateは消化される過程でライソゾーム膜に何らかの障害を及ぼしていることになる。さらにautophagosome、cytosegresomeがみられることから、immune complexはライソゾーム膜阻害因子として滑膜表層細胞にtoxicに作用している。その結果、Type A cellは破壊されて脱顆粒を起し、組織障害に関与することが考えられる。注入初期の関節Arthus様現象でみられるフィブリン、赤血球、PMNの炎症性滲出物はいずれも滑膜表層細胞に取り込まれる。immune complexによる組織障害作用の他に、炎症性滲出物に対する自己免疫反応は関節炎の慢性化⁶⁹⁾につながるといわれ、二次性組織障害を起す可能性がある。

immune complexを繰返し注入すると著しい増生、免疫反応を伴った慢性関節炎が発症するが、これは

RAに類似した関節炎である。ここでみられるリンパ球、形質細胞を中心とした免疫反応は抗原(BSA等)に対する抗体の他に抗immune complex抗体を産生している可能性がある。RFはaggregated IgGに対する抗体と言われているが、immune complexに対する抗体ともみなされる⁷⁰⁾。immune complexをウサギに感作すると、RFに類似した因子(RFLS)が出現することが知られている⁷¹⁾。これはIgG抗体に対する抗体を意味するもので、immune complexはaggregated IgG、変性IgGと同様の抗原性を有するものと理解される。このような慢性関節炎の発症にはアレルギー機構の介在するlysosomal enzyme由来の組織障害の他に、自己免疫反応の関与が想定された。この免疫反応の関与はimmune complexによる組織障害機序をより複雑なものにしているといえる。

Type B cell の増生とその細胞間基質

Type B cellについてはimmune complex注入後1～3日目にかけて、その増生がみられ、rERの増生および拡張を伴っている。この増生および拡張は注入後2時間頃頃から始まり、5日目頃まで持続する。このような所見は細胞質内での蛋白合成促進を意味すると言われるが、明確なる根拠はない。ときにrERのcisternaが著しく嚢胞状に拡張したものを認めるが、これは生合成された物質が異常に貯溜したためと考えられる。

増生するType B cellの表面には膠原線維、aperiodic fibrilが混在し、その増加がみとめられた。特にaperiodic fibrilはType B cellから基質に放出される如き所見が得られた。ウサギ正常滑膜基質では深層に膠原線維、中間層および表層にaperiodic fibrilがよく観察される。特にType B cell周辺にaperiodic fibrilがみられるが、これは細胞間マトリックスのmicrofibrilに相当する。microfibrilは直径約50～80Åのフィラメント様物質(microfilament)と直径100～150Åのmicrofibrilに区別される⁷²⁾。microfilamentは中等度の電子密度を持ち、等質性物質に包埋されている。この物質の本態は明らかでないが、細胞間マトリックスの成分を構成していることが考えられており、最近ではAMPS結合蛋白ではないかと言われている。Type B cellは形態的に線維芽細胞と類似しており、機能的にも類似性を持っていることが考えられる。

1～3日目の組織化学的所見から滑膜基質に存在

する AMPS の大部分がヒアルロン酸であることが示唆された。また杉山の方法によって処置した滑膜標本は CPC・ホルマリン固定の標本に比べて滑膜基質 AMPS が広範囲に陽性で、フィブリノイド膨化部、Type B cell でその傾向が著しい。滑膜基質とくに Type B cell 周辺では AMPS は蛋白と結合した状態 (hyaluronateprotein) で存在しており、その増加を示す所見であった。

組織化学的に滑膜基質の AMPS, hyaluronateprotein が増加する所見は Type B cell の増生, aperiodic fibril の増加と関係があり、Type B cell あるいはその周辺で AMPS 結合蛋白の代謝、合成が行なわれている可能性がある。このような滑膜基質の組織化学的变化は滑膜病態を反映しているものと考えられる。Type B cell の増生、AMPS の増加する所見は炎症に対する防禦反応として理解される。

最後に、著者が使用した immune complex は大部分 IgG complex で、RA の病因と考えられている RF-immune complex とは同一のものではないが、IgG complex と IgM complex の持つ生物学的活性の類似性を考えあわせ、RA の組織障害因子として IgG-RF complex の重要性を強調したい。

今後さらに RA の発症機序に関連し、IgG-RF (IgM) complex の持つ組織障害、補体の関与についてさらに究明する必要があると思われる。

結 語

著者は RF-immune complex による関節病態変化、さらにその組織障害機序を研究するためのアプローチとして、抗 BSA ウサギ抗体より作製した soluble immune complex を同種ウサギ膝関節腔へ注入してアレルギー性関節炎を発症させた。その関節組織、特に滑膜を中心に組織、蛍光、電顕、組織化学的方法にて経時的に観察した。さらに immune complex による関節組織障害機序について検討するとともに、RA の組織障害にアレルギー機構の関与を重要視し、RF-immune complex の持つ組織障害の可能性について言及した。

1. soluble immune complex をウサギ膝関節腔へ注入すると、アレルギー性関節炎が発症する。この関節炎は Arthus 現象で代表される即時型反応および細胞増生を主体とする遅延型反応を伴った一連のアレルギー性病変を惹起していることが強く示唆された。

2. immune complex を繰返し4回以上注入すると

リンパ濾胞、パンス形成を伴った RA に類似した慢性関節炎が発症する。

3. immune complex は PMN, 滑膜表層細胞、滑膜表層細胞由来の macrophage の phagosome 内に取り込まれる。

4. immune precipitate を貪食した Type A cell (Barland) は二次ライソゾームの活性が急速に促進する。

5. immune complex 注入後1日目頃に PMN の脱顆粒がみられるが、この所見は immune complex によるアレルギー性組織障害の発現に重要なものと考えられる。

6. immune complex はライソゾームの膜阻害因子として滑膜表層細胞 (Type A cell) に toxic に作用する。その結果 Type A cell は破壊され、脱顆粒を起し、組織障害に関与することが考えられた。

7. 滑膜組織障害の著しい1~3日目には Type B cell (Barland) の増生およびその細胞周辺基質に aperiodic fibril の増加する所見が得られた。組織化学的に滑膜基質 AMPS は増加している。この AMPS の大部分がヒアルロン酸であり、滑膜基質、特に Type B cell 周辺で蛋白と結合した状態で存在している。

8. immune complex によるアレルギー性関節炎の発症に関連して、その関節組織障害機序について考察を加えた。

RA の組織障害の発現にアレルギー性機構の関与を考えるとき、RF-immune complex の持つ意義は大きいものと推測した。

本研究の要旨は第19回日本リウマチ学会総会 (京都) において発表した。最後に御指導と御校閲を賜った河合博正教授に謝意を表するとともに研究に協力していただいた川原一祐講師、教室諸氏に感謝します。

文 献

- Hollander, J. L., MacCarty, D. J., Astorga, G. and Castro-Murillo, E.: Studies on the pathogenesis of rheumatoid joint inflammation. I. The "R. A. cell" and a working hypothesis. *Ann. intern. Med.*, 62: 271-280, 1965
- 清水 保, 松村則幸: 関節リウマチおよびその類縁疾患の蛍光抗体法による研究. *リウマチ*, 7:

- 240-242, 1967
- 3) Hamerman, D. : New thoughts on the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Amer. J. Med.*, 40 : 1-9, 1966
 - 4) Weissmann, G. : Lysosomes and joint disease. *Arthr. and Rheum.*, 9 : 834-840, 1966
 - 5) 塚田直敬 : Soluble immune complex 関節内注入によるウサギの実験的関節炎. *信州医誌*, 22 : 245-258, 1974
 - 6) Okumura, K., Kondo, Y. and Tada, T. : Studies on passive serum sickness. I. The glomerular fine structure of serum sickness nephritis induced by preformed antigen-antibody complexes in the mouse. *Lab. Invest.*, 24 : 383-391, 1971
 - 7) Ainsworth, S. K. and Karnovsky, M. J. : An ultrastructural staining method for enhancing the size and electron opacity of ferritin in thin sections. *J. Histochem. Cytochem.*, 20 : 225-229, 1972
 - 8) 川原一祐 : 人体好中球顆粒の電顕的細胞化学. *信州医誌*, 18 : 978-993, 1969
 - 9) Sugiyama, T. : Histochemical studies on acid mucopolysaccharides. I. On some new methods and differentiation in tissue sections. *Acta. Path. Jap.*, 14 : 413-431, 1964
 - 10) Sugiyama, T. : The mechanism of specific staining of acid mucopolysaccharide by alcian blue : on the influence of urea treatment on the stainability. *Acta. Histochem. Cytochem.*, 1 : 16-30, 1968
 - 11) Kawamura, A. : Fluorescent antibody techniques and their applications. University of Tokyo Press and University park press, Tokyo, Baltimore, 1967
 - 12) Barland, P., Novikoff, A. B. and Hamerman, D. : Electron microscopy of the human synovial membrane. *J. Cell. Biol.*, 14 : 207-220, 1962
 - 13) Ghadially, F. N. and Roy, S. : Ultrastructure of rabbit synovial membrane. *Ann. rheum. Dis.*, 25 : 318-325, 1966
 - 14) Germuth, F. G. and Mckinnon, G. E. : Studies on the biological properties of soluble antigen antibody complexes. *Bull Johns Hopk. Hosp.*, 101 : 13-42, 1957
 - 15) Tokuda, S. and Weiser, R. S. : Production of anaphylaxis in the white mouse with soluble antigen-antibody complexes. *Science*, 127 : 1237-1238, 1958
 - 16) Ishizaka, K. and Campbell, D. H. : Biological activity of soluble antigen-antibody complexes. I. Skin reactive properties. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, 97 : 635-638, 1958
 - 17) Ishizaka, K., Ishizaka, T. and Campbell, D. H. : Biological activity of soluble antigen-antibody complexes. II. Physical properties of soluble complexes having skin-irritating activity. *J. exp. Med.*, 109 : 127-143, 1959
 - 18) McClausky, R. T. and Benacerraf, B. : Localization of colloidal substances in vascular endothelium. A mechanism of tissue damage. II. Experimental serum sickness with acute glomerulonephritis induced passively in mice by antigen-antibody complexes in antigen excess. *Amer. J. Path.*, 35 : 275-295, 1959
 - 19) McClausky, R. T., Benacerraf, B., Potter, J. L. and Miller, F. : The pathologic effects of intravenously administered soluble antigen-antibody complexes. I. Passive serum sickness in mice. *J. exp. Med.*, 111 : 181-194, 1960
 - 20) Ishizaka, K., Ishizaka, T. and Sugahara, T. : Biological activity of aggregated γ -globulin. III. Production of Arthus-like reactions. *J. Immunol.*, 86 : 220-227, 1961
 - 21) Hirose, S. : The biologic activities of denatured human IgG and its heavy chains. *J. Immunol.*, 104 : 753-758, 1970
 - 22) Ishizaka, K. and Ishizaka, T. : Biologic activity of aggregated γ -globulin. II. A study of various methods for aggregation and species differences. *J. Immunol.*, 85 : 163-171, 1960
 - 23) Ishizaka, K., and Ishizaka, T. : Molecular basis of passive sensitization. II. The role of fragment III of γ -globulin and its disulfide bonds in passive sensitization and comple-

- ment fixation. *J. Immunol.*, 93 : 59-68, 1964
- 24) Tada, T. and Ishizaka, K. : Arthus type inflammation with rabbit γ M antibody. *J. Immunol.*, 96 : 112-118, 1966
- 25) 山口寿夫, 中島壯太, 竹内 広, 福田純也, 影山圭三 : 実験アレルギーにおける微少循環障害. *アレルギー*, 20 : 154-158, 1971
- 26) 多田富雄, 奥村 康 : Immune complex による血清病型病変の発生. *最近医学*, 25 : 1870-1876, 1970
- 27) Hollister, J. R., Liang, G. C. and Mannik, M. : Immunologically induced acute synovitis in rabbit, studies of immune complexes in synovial fluid. *Arthr. and Rheum.*, 16 : 10-20, 1973
- 28) Mannik, M. and Arend, W. P. : Fate of preformed immune complexes in rabbits and rhesus monkeys. *J. exp. Med.*, 134 : 19-40s, 1971
- 29) de Duve, C., Pressman, B. C., Gianetto, R., Wattiaux, R. and Appelmans, F. : Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem. J.*, 60 : 604-617, 1955
- 30) de Duve, C. : The lysosome concept. In *Ciba Foundation Symposium on Lysosomes*. pp. 1-30, Little Brown, Boston, 1963
- 31) Novikoff, A. B. : Lysosomes in the physiology and pathology of cells : contributions of staining methods. In *Ciba Foundation Symposium on Lysosomes*. pp. 36-73, Little Brown, Boston, 1963
- 32) Barland, P., Novikoff, A. B. and Hamerman, D. : Fine structure and cytochemistry of the rheumatoid synovial membrane, with special reference to lysosomes. *Amer. J. Path.*, 41 : 853-865, 1964
- 33) Wyllie, J. C., Haust, M. D. and More, R. H. : The fine structure of synovial lining cells in rheumatoid arthritis. *Lab. Invest.*, 15 : 519-529, 1966
- 34) Ghadially, F. N. and Roy, S. : Ultrastructure of synovial membrane in rheumatoid arthritis. *Ann. rheum. Dis.*, 26 : 426-443, 1967
- 35) Weissmann, G. : Lysosomes. *New Eng. J. Med.*, 11 : 1084-1090, 1965
- 36) de Duve, C. and Wattiaux, R. : Functions of lysosomes. *Ann. Rev. Physiol.*, 28 : 435-492, 1966
- 37) Weissmann, G. : The role of lysosomes in inflammation and disease. *Ann. Rev. Med.*, 18 : 97-112, 1967
- 38) Norton, W. L. and Ziff, M. : Electron microscopic observations on the rheumatoid synovial membrane. *Arthr. and Rheum.*, 9 : 589-610, 1966
- 39) Ericsson, J. L. E. : Mechanism of cellular autophagy. In *lysosomes in biology and pathology*. Vol. 2, pp. 345-349, North-Holland, pub. co., Amsterdam, London, 1969
- 40) Roy, S. and Ghadially, F. N. : Synovial membrane in experimentally-produced chronic haemarthrosis. *Ann. rheum. Dis.*, 28 : 402-414, 1969
- 41) Flle, H. B. and Mellanby, E. : The effect of hypervitaminosis A on embryonic limb-bones cultivated in vitro. *J. Physiol (Lond.)*, 116 : 320-349, 1952
- 42) Thomas, L., McClusky, R. T., Potter, J. L. and Weissmann, G. : Comparison of the effects of papain and vitamin A on cartilage. I. The effects in rabbits. *J. exp. Med.*, 111 : 705-718, 1960
- 43) Dingle, J. T. : Lysosomal enzymes and the degradation of cartilage matrix. *Proc. roy. Soc. Med.*, 55 : 109-111, 1962
- 44) Dingle, J. T. : The role of lysosomes in connective tissue disease. In *Modern trends in rheumatology*. pp. 110-120, A. G. S. Hill, Butterworth, London, 1966
- 45) Lack, C. H. : Experimental models of rheumatoid arthritis. *Med. Clin. N. Amer.*, 52 : 667-672, 1968
- 46) Lack, C. H. : Lysosomal enzymes in experimental and rheumatoid arthritis. In *Lysosomes in biology and pathology*. vol. 2, pp. 87-110, North-Holland, pub. co., Amsterdam, London, 1969

- 47) Weissmann, G. : Labilization and stabilization of lysosomes. *Fed. Proc.*, 23 : 1038-1044, 1964
- 48) Weissmann, G., Becher, B., Widermann, G. and Bernheimer, A. W. : Studies on lysosomes. VII. Acute and chronic arthritis produced by intra-articular injections of streptolysin S in rabbits. *Amer. J. Path.*, 46 : 129-147, 1965
- 49) Weissmann, G. : Lysosomes, autoimmune phenomena, and diseases of connective tissue. *Lancet*, 26 : 1373-1375, 1964
- 50) Zvaifler, N. J. : A speculation on the pathogenesis of joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthr. and Rheum.*, 8 : 289-293, 1965
- 51) Thomas, D. P. P. : The role of lysosomes in rheumatoid disease. In *Rheumatology*. pp. 29-50, K. Basel, New York, 1967
- 52) Persellin, R. H. : Role of lysosomes in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Med. Clin. N. Amer.*, 52 : 635-641, 1968
- 53) Coombs, R. R. A. and Gell, P. G. H. : Clinical aspects of immunology. p. 317, Blackwell scientific pub., Oxford, 1963
- 54) Coombs, R. R. A. and Fell, H. B. : Lysosomes in tissue damage mediated by allergic reactions. In *Lysosomes in biology and pathology*. vol. 2, pp. 3-18, North-Holland, pub. co., Amsterdam, London, 1969
- 55) Daem, W. T. and Oort, J. : Electron microscopic and histochemical observations on polymorphonuclear leucocytes in the reversed Arthus reaction. *Exp. Cell Res.*, 28 : 11-20, 1962
- 56) Lovett, C. A. and Movat, H. Z. : Role of PMN-leukocyte lysosomes in tissue injury, inflammation and hypersensitivity. III. Passive cutaneous anaphylaxis induced in the rat with homologous and heterologous hyperimmune antibody. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)*, 122 : 991-996, 1966.
- 57) Uriuhara, T. and Movat, H. Z. : The role of PMN-leukocyte lysosomes in tissue injury, inflammation and hypersensitivity. I. The vascular changes and the role of PMN-leukocytes in the reversed passive Arthus reaction. *Exp. molec. Path.*, 5 : 539-558, 1966
- 58) Movat, H. Z., Uriuhara, T., Taichman N. S., Rowsell, H. C. and Mustard, J. F. : The role of PMN-leukocyte lysosomes in tissue injury, inflammation and hypersensitivity. VI. The participation of the PMN-leukocyte and the blood platelet in systemic aggregate anaphylaxis. *Immunol*, 14 : 637-648, 1968
- 59) Graham, R. C. and Griffin, R. : Arthus synovitis with horseradish peroxidase as antigen: sequential participation of platelets and leucocytes. *Br. J. exp. Path.*, 53 : 578-585, 1972
- 60) Astorga, G. and Bollet, A. J. : Diagnostic specificity and possible pathogenetic significance of inclusions in synovial leucocytes. *Arthr. and Rheum.*, 8 : 511-523, 1965
- 61) Janoff, A. and Zeligs, J. D. : Vascular injury and lysis of basement membrane in vitro by neutral protease of human leukocytes. *Science*, 161 : 702-704, 1968
- 62) Weissmann, G., Zurier R. B., Spieler, P. J. and Goldstein, I. M. : Mechanisms of lysosomal enzyme release from leukocytes exposed to immune complexes and other particles. *J. exp. Med.*, 134 : 149-165s, 1971
- 63) Henson, P. M. : Interaction of cells with immune complexes : adherence, release of constituents, and tissue injury. *J. exp. Med.*, 134 : 114-135s, 1971
- 64) Cooke, T. D. and Jasin, H. E. : The pathogenesis of chronic inflammation in experimental antigen-induced arthritis. I. The role of antigen on the local immune response. *Arthr. and Rheum.*, 15 : 327-337, 1972
- 65) Webb, F. W. S., Ford, P. M. and Glynn, L. E. : Persistence of antigen in rabbit synovial membrane. *Br. J. exp. Path.*, 52 : 31-35, 1971
- 66) Müller, P., Raabe, G. and Thoss, K. : BSA-induced allergic arthritis and formol-induced non-allergic arthritis in rabbits. I. Compar-

- tive studies on morphological features and courses of the disease. *Exp. Path.*, 8: 331-340, 1973
- 67) Cook, T. D., Hurd, E. R., Ziff, M. and Jasin, H. E.: The pathogenesis of chronic inflammation in experimental antigen-induced arthritis. *J. exp. Med.*, 135: 332-338, 1972
- 68) Dumonde, D. C. and Glynn, L. E.: The production of arthritis in rabbits by an immunological reaction to fibrin. *Br. J. exp. Path.*, 43: 373-383, 1962
- 69) Glynn, L. E.: The chronicity of inflammation and its significance in rheumatoid arthritis. *Ann. rheum. Dis.*, 27: 105-121, 1968
- 70) 堀内淑彦, 三島 隆, 安達昌昭: リウマチ様関節炎, -リウマチ因子を中心として-. *総合医学*, 21: 187-195, 1964
- 71) 岩本幸子, 根来すみ子, 荻原忠夫, 広瀬俊一: 抗 immune complex の産生とその活性について. *リウマチ*, 13: 465, 1973
- 72) Low, F. N.: Microfibril, fine filamentous components of the tissue space. *Anat. Rec.* 142: 131-137, 1962

(50. 7. 19 受稿)