

リウマチ滑膜のヘマトポルフィリン沈着形式と
レーザー照射の滑膜細胞破壊の研究
(0 1 5 7 0 8 5 2)

平成2年度 科学研究費補助金(一般研究C)
研 究 成 果 報 告 書

平成4年1月

研究者代表 井 上 和 彦

(東京女子医科大学

助教授)

平成2年度 科学研究費補助金（一般研究C）
研究成果報告書

- (1) 課題番号 01570852
- (2) 研究課題 リウマチ滑膜のヘマトポルフィリン沈着形式とレーザー照射の滑膜細胞破壊の研究
- (3) 研究代表者 井上和彦（東京女子医大，医学部，助教授）
- (4) 研究分担者 千葉純司（東京女子医大，医学部，助手）
持田 睦（東京女子医大，医学部，助手）
- (5) 研究経費
- | | |
|------|---------|
| 平成1年 | 800千円 |
| 平成2年 | 800千円 |
| 計 | 1,600千円 |

(6) 研究発表

ア) 学会誌

- 1) 井上和彦, 大辻孝昭, 金 強中, 千葉純司, 佐藤和人
慢性関節リウマチに対する低出力YAGレーザー
照射効果 第1報
(動物実験および臨床効果)
Effects of YAG laser irradiation for rheumatoid arthritis ;
Preliminary report
第11回 日本レーザー医学会大会論文集 1991

イ) 口頭発表

- 1) Kazuhiko Inoue
Effects of YAG laser exposure in the treatment of
rheumatoid arthritis
X VII Congressoilar De reumatologia
Rio de Janeiro-Brazil 1989

- 2) 井上和彦
慢性関節リウマチに対する低出力 YAG レーザー照射の臨床経験
第 33 回 日本リウマチ学会総会 東京 1989
- 3) 井上和彦, 千葉純司, 石井重雄, 佐藤和人
アジュバント関節炎への低出力 YAG レーザー照射の効果
第 34 回 日本リウマチ学会総会 大阪 1990
- 4) 井上和彦, 堀越万理子, 藤永 悟, 津村 弘
慢性関節リウマチへの低出力 YAG レーザー照射の効果と皮下血流量
の変動
第 34 回 日本リウマチ学会総会 大阪 1990
- 5) 井上和彦, 大辻孝昭, 金 強中, 佐藤和人
慢性関節リウマチに対する低出力 YAG レーザー照射効果 第 1 報
(動物実験および臨床効果)
第 11 回 日本レーザー医学会大会 東京 1990
- 6) Kazuhiko Inoue., Kazuto Sato., Junji Chiba
Effects of Low Power YAG Laser for Ajuvant Arthritis of Rat
The Second World Congress International Society for Low
Power Laser Applicatoins in Medicine Tokyo 1990
- 7) 井上和彦, 大辻孝昭
アジュバント関節炎に対する 5 種低出力レーザー照射の効果
第 12 回 日本レーザー医学会大会 東京 1991
- 8) 井上和彦, 米本光一
関節鏡視下手術における炭酸ガスおよびヤグレーザーの役割
第 12 回 日本レーザー医学会大会 東京 1991
- 9) 井上和彦, 大辻孝昭, 石井重雄, 堀越万理子, 中村潤一郎
YAG レーザーのリウマチへの照射の臨床的検討
第 35 回 日本リウマチ学会総会 東京 1991

〈本研究のポイント〉

光化学物質であるヘマトポルフィリンの慢性関節リウマチ滑膜への局在・期間等を検討し、ヘマトポルフィリンを利用した炎症滑膜のみを選択的に除去する滑膜切除術を開発する。慢性関節リウマチ（RA）の滑膜炎をこの方法でコントロールし、関節破壊を予防する臨床的応用のための基礎的研究である。

〈はじめに〉

RA患者は本邦では40万人以上であり、その障害による社会の損失は大きい。RAの病因が不明である現在、自己免疫不全と考えられる全身性炎症とそれによる滑膜炎を確定的にコントロールできる薬剤はなく、RAの多くは滑膜炎が継続し、滑膜より放出される酵素等化学物質により関節軟骨が障害され、障害が軟骨下骨に波及し、関節破壊が進行していく。関節破壊を予防するためには、軟骨障害酵素を放出しているRA性炎症活動性滑膜を除去するか、機能を停止させれば目的は達する。

一方、ヘマトポルフィリン誘導体（HPD）は一定の波長の光により励起され活性化し、細胞破壊作用を有する。そして、HPDは腫瘍細胞内に正常細胞に比し大量に、かつ長期に蓄積することが知られている。これらの事実より肺癌治療等においてHPDを静注し、肺癌細胞内にHPDを蓄積させて、内視鏡視下にアルゴン・ダイレーザーを照射し、癌細胞のみを選択的に破壊し、正常細胞には障害を及ぼさない癌細胞選択的切除法が実施され効果をあげている。HPDは癌細胞の他に炎症細胞にも蓄積することが知られている。そこで肺癌治療方式を利用して、RA炎症滑膜選択的切除を計画した。まずHPDがRAの動物実験モデルとしてラットのアジュバント関節炎滑膜にどのように蓄積しているかを検討し、アジュバント関節炎にアルゴン・ダイレーザーを照射し、関節炎の推移を観察する。RA膝関節滑膜を培養し、培地内へHPDを投与して滑膜細胞のとり込み状態およびアルゴン・ダイレーザー照射による殺滑膜細胞効果を観察する。殺滑膜細胞効果は病理学的に、生化学的に検討する。活性化されたHPDがどのようなメカニズムにより殺滑膜細胞効果を

発現するかの推論を試みる。

〈方 法〉

ラットの右後肢にアジュバントを注入し、アジュバント関節炎を作製し、両後肢体積を連日、測定する。アジュバント関節炎が完成した後に、ラット腹腔内へ HPD を 2 mg/kg 注入し、24 時間後、48 時間後そして 72 時間後に後肢の滑膜を含めた腫脹部分を摘出して、アルゴン・ダイレーザーを照射して、組織からの蛍光を肉眼的に又、蛍光計により測定する。RA 患者関節鏡視下滑膜切除時に採取した滑膜を培養し、培地内へ HPD を注入し、アルゴン・ダイレーザー照射による滑膜細胞変化を観察する。滑膜より培地内に放出される免疫生化学物質の測定を行う。培養滑膜細胞にとり込まれた HPD が細胞のどの部分にとり込まれるかをアルゴン・ダイレーザー照射下に組織からの蛍光を顕微鏡的に検討する。RA 滑膜細胞に HPD をとり込ませ、培地にアルゴン・ダイレーザーを照射し、培地内のスーパーオキシドをチトクローム還元法により測定する。

〈結 果〉

ラット後肢へアジュバント注入後、連日後肢の体積を測定すると注入翌日より両後肢体積は増減を繰り返しながら徐々に増加し、注入後 21～22 日目より後肢体積はほぼ一定となった。(表-1) アジュバント関節炎が完成したと判断し、腹腔内へ 2 mg/kg の HPD を注入し、直後、12 時間後、24 時間後、48 時間後そして 72 時間後の後肢足関節部の腫脹部分を摘出した。コントロールとしては正常ラット腹腔内へ 2 mg/kg の HPD を注入し、12 時間後、24 時間後、48 時間後、そして 72 時間後に後肢足関節部をアジュバント関節炎例と同様に摘出した。そして、HPD を注入しない正常ラットの後肢足関節部を摘出した。各摘出標本にアルゴン・ダイレーザー (488 nm) 出力 20mW を照射し、肉眼的に蛍光の発現程度を観察した。HPD を注入したアジュバント関節炎例では蛍光計により蛍光強度を測定した。正常ラットで HPD を注入していない症例ではアルゴン・ダイレーザー照射によっても蛍光を認めな

かった。正常ラットに HPD を注入後の蛍光発現は 24 時間後に軽度認められたものの、48 時間後、72 時間後には蛍光はほとんど認められなかった。アジュバント関節炎に HPD を注入したラットでは 24 時間後、48 時間後、72 時間後ともに強い蛍光を肉眼的に認めた。肉眼的な蛍光の強さでは、48 時間後は 24 時間後、72 時間後に比較して強い蛍光を示した。(表-2) 蛍光計によると蛍光強度は 48 時間後が最大であり、24 時間後、72 時間後はほぼ同等で 48 時間後に比較してやや低値を示した。(表-3)

RA の膝関節滑膜増殖例には、関節鏡視下にパンチにより滑膜切除を施行する。この時採取した血流が豊富で、炎症の強い赤色系滑膜を組織培養した。滑膜組織周辺では線維芽細胞を中心に樹枝状細胞が少数混在して増殖していた。無刺激下に組織培養中の上清液を採取し、インターロイキン-1、2 そして 3 を測定すると炎症が強いと考えられる RA 赤色系滑膜ではインターロイキン-1 の測定値が変形性膝関節症等のコントロールと比較して有意に高値を示したが、インターロイキン-2 そして 3 の測定では、コントロールに比し、高値を示さず有意差は認めなかった。

組織培養中培地内へ HPD を投与し、アルゴン・ダイレーザー照射を行った。コントロールとしては、HPD 投与もアルゴン・ダイレーザー照射も行わない群、HPD 投与は行うが、アルゴン・ダイレーザー照射は行わない群、HPD は投与せず、アルゴン・ダイレーザー照射のみを行う群とした。コントロールのいずれの群においても、滑膜細胞の増殖抑制および線維芽細胞および樹枝状細胞の分布にも変化は認められなかった。しかし、HPD 投与とアルゴン・ダイレーザー照射を同時に行うと滑膜細胞はそのほとんどが照射により壊死を起こしたが、培養を継続していると線維芽細胞のみの少数の増殖を認めた。又、培養上清中へ多量のインターロイキン-1 を放出していた RA 滑膜組織は、HPD とアルゴン・ダイレーザーにより、インターロイキン-1 の放出を行わなくなった。

アジュバント関節炎ラットに HPD を腹腔内へ注入し 48 時間を経過時にアル

ゴン・ダイレーザーを後肢足関節部に照射した。アルゴン・ダイレーザーは 488 nm, 20 mW, 1 分間実施した。HPD 腹腔内注入ある・なしにかかわらず、後肢足関節腫脹部の変化は、病的には HE 染色による光顕所見において、強い炎症細胞の浸潤、間質細胞増殖を認めたが、繊維化、浮腫、壊死の変化はいずれも軽度であった。免疫病的には Ia-抗原の強い発現を認めた。アルゴン・ダイレーザー照射後の病理学的検討では、血管を中心とした壊死を認めた。当然のことながら壊死部分には、免疫病理の Ia-抗原の発現は認められなかった。

さらに、HPD が炎症滑膜細胞のどの部分に沈着しているかの検討で、遠心分離法および病理切片にアルゴン・ダイレーザーを照射して観察する方法では、蛍光が強度である等、種々の問題より HPD が細胞のどの部分に沈着しているかを同定することができなかった。

炎症滑膜細胞に HPD をとり込ませた後に、アルゴン・ダイレーザーを照射し、チトクローム C 還元法によりスーパーオキシドの測定では、スーパーオキシドは増加していたが、統計学的に有意な上昇ではなかった。

< 考 察 >

HPD は癌細胞に大量に、長期にわたって存在することより^{1), 2), 3), 4), 5)} 癌細胞を選択的に死滅させる治療法が確立し、優秀な治療効果をあげている。HPD は癌細胞に選択的に蓄積するばかりでなく、急性炎症細胞にも選択的に蓄積する¹⁾ことが知られている。そこで、RA の炎症滑膜細胞に HPD を蓄積させることができれば炎症細胞のみを選択的に死滅させ、正常滑膜細胞には影響を与えない滑膜切除術が可能となる。この選択的滑膜切除術では正常滑膜細胞に影響を与えないため、RA の早期より滑膜切除が可能となり、画期的治療法となる。

アジュバント関節炎（ラット）では腹腔内注入後 48 時間後に滑膜における HPD の濃度は最高であった。関節鏡視施行時に採取した滑膜を培養し培地内に HPD を投与すると滑膜細胞は沈着部位は不明であるが、HPD をとり込んだ。RA 炎症活動性滑膜は HPD をとり込むことが判明し、HPD をとり込んだ滑膜

細胞を機能停止又は死滅させるためには、癌治療において行われているように HPD を活性化させるアルゴン・ダイレーザー（630 nm）を照射した。HPD 投与後のアルゴン・ダイレーザー照射ではアジュバント関節炎では炎症部位に壊死を起こし、培養滑膜細胞では増殖が停止し、その後起こった細胞増殖では、線維芽細胞が認められたのみであった。RA 炎症活動性滑膜細胞は HPD を多量に、長期間にわたって蓄積し、これにアルゴン・ダイレーザーを照射すると、HPD は活性化される。活性化 HPD は殺細胞効果があり、これにより、HPD をとり込んだ炎症活動性滑膜細胞のみが死滅する。HPD が殺細胞効果を発揮するメカニズムとしては HPD から発生するスーパーオキシドにより RA 炎症滑膜細胞が破壊されると考えてよい。^{3), 4), 5)}

これらの結果より、臨床的に応用できる選択的滑膜切除術を図式化すると図-1 のようになる。選択的滑膜切除の適応のある患者に、術前48時間に、HPD を 2 mg/kg 静注する。全身的影響を考慮すると関節内投与も考慮される。HPD 投与後48時間に関節鏡視を施行する。クオートファイバーにて関節内へアルゴン・ダイレーザーを導入し、関節鏡視下に関節内をアルゴン・ダイレーザーによりスキャンし、関節内滑膜全体にアルゴン・ダイレーザーを照射する。その後、関節内を十分に生理食塩水により洗浄する。これが臨床的に RA に対する炎症活動性滑膜選択的切除術式となる。HPD による皮膚の日光過敏症の問題等、解決すべきことは残されているが、画期的方法である。

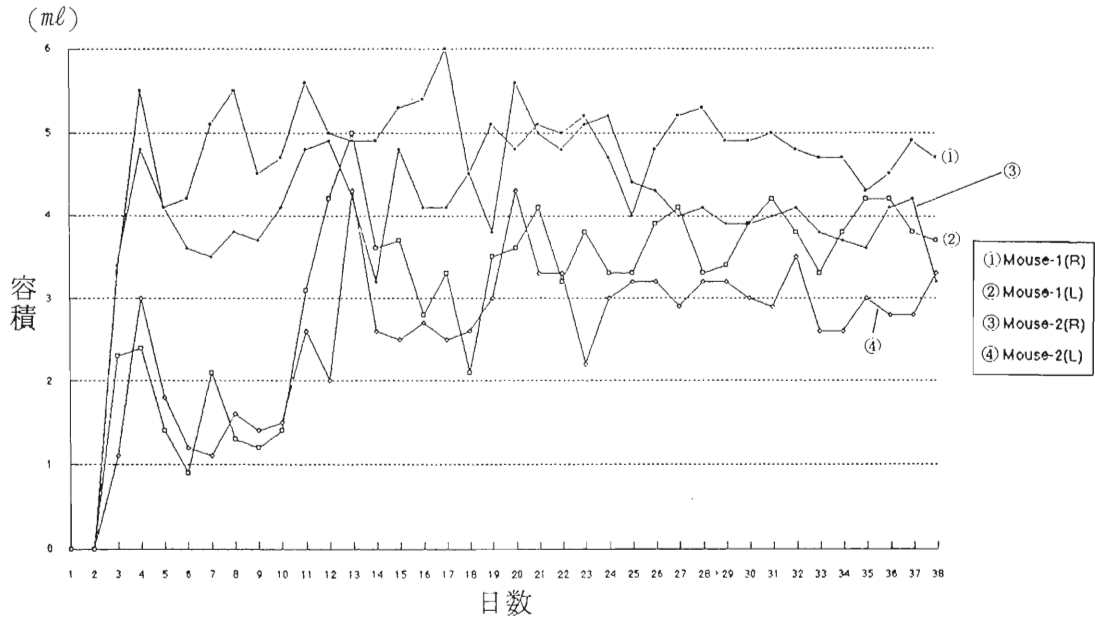
〈ま と め〉

RA の炎症活動性滑膜細胞に HPD は癌細胞と類似した型式で蓄積された。アルゴン・ダイレーザーを照射することにより HPD は活性化され、放出されたスーパーオキシドの殺細胞効果により炎症活動性滑膜細胞は死滅した。これらの結果により、臨床的に炎症活動性滑膜選択的切除術が可能となった。

文 献

- 1) H. B. Gregorie Jr., E. O. Horger, J. L. Ward et al.
Hemato porphyrin- derivative fluorescence in malignant neoplasms
Annals of Surgery, 167, 820 ~ 828, 1968.
- 2) D. S. Barker, R. W. Henderson, E. Storey, The in vivo localization
of Porphyrins Br. J. exp. Path. 51, 628 ~ 638, 1970.
- 3) 早田義博, 加藤治文, 小野寿太郎 他 肺癌とレーザー
日本胸部臨床 40, 383 ~ 389, 昭和56年
- 4) 加藤治文, 小中千守, 小野寿太郎 他 レーザー光線による診断・治
療, 診断と治療 2081 ~ 2087, 昭和56年
- 5) 山田 修, レーザー光線のマウス造血幹細胞への影響に関する研究
東女医大誌 52, 848 ~ 855, 昭和57年

表-1 アジュバント関節炎の経過



(右後肢にアジュバントを注入，両後肢体積を測定)

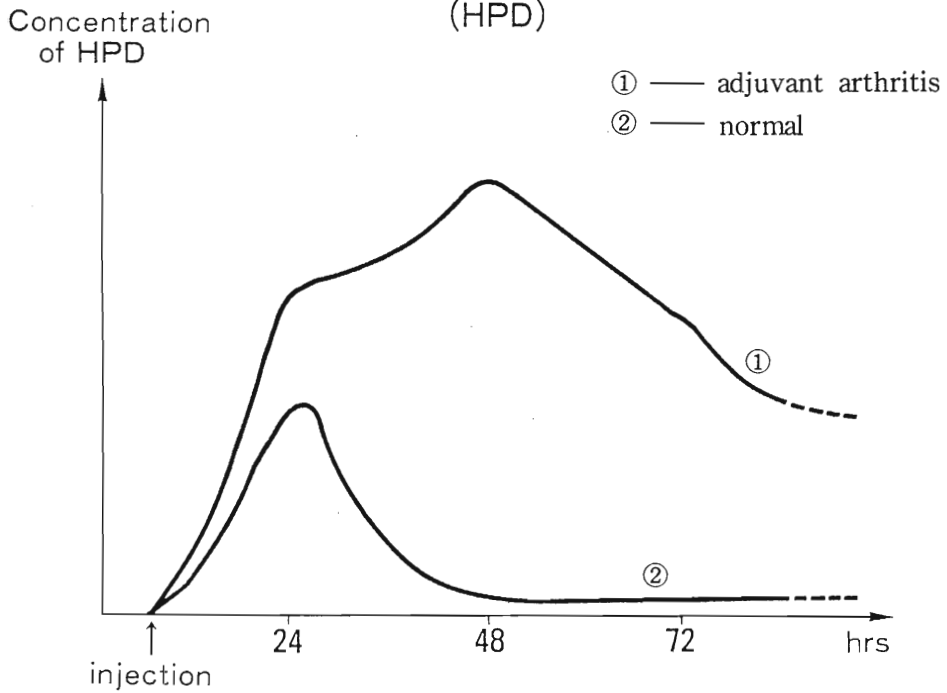
表 - 2

アルゴン・ダイレーザー照射による滑膜の蛍光発現度からみた
 ヘマトポルフィリン (HPD) の滑膜への分布

HPD 注入後	正常ラット HPD (-)	正常ラット HPD (+)	アジュバント関節炎 HPD (+)
24 時間	--	+	++
48 時間	-	-	+++
72 時間	-	-	++

表 - 3

DISTRIBUTION of HEMATOPORPHYRIN in SYNOVIUM (HPD)



Institute of Rheumatology, Tokyo

☒ - 1

LASER SELECTIVE SYNOVECTOMY

