

各種抗リウマチ剤における細胞性免疫能抑制作用ならびに 血漿総活性酸素消去酵素(S. O. D.)活性に関するウサギ実験

井 上 治

Immuno-suppressive Effect of Anti-rheumatic Drugs Regarding Plasma Total Superoxide Dismutase (S. O. D) Activity in Rabbits

INOUE, O.

Adrenocortical steroids (steroid) have an immuno-suppressive as well as anti-inflammatory effects, while Sodium aurothiomalate (Shiozol) and Methotrexate (MTX) have been reported to have some immuno-related effect on rheumatic arthritis (RA). Twenty rabbits in four groups were examined every three weeks by PHA regarding cellular immunity, and plasma total S. O. D. activity (SOD activity) for the whole body S. O. D. level, while Predonine 2.5mg (50mg/human) daily, Shiozol 2mg (40mg/human) weekly, or MTX 1.0mg (20mg/human) weekly was administered intramuscularly. Predonine showed a strong immuno-suppressive effect, and the SOD activity was also decreased. After the administration of Predonine was stopped, a rebound increase in the SOD activity was noticed which thus suggested the effectiveness of steroid pulse therapy. Shiozol and MTX demonstrated transient immuno-suppression in some rabbits, but no significant changes in the SOD activity were observed.

Key Words : anti-rheumatic drugs, cellular immunity, plasma total superoxide dismutase activity

はじめに

慢性関節リウマチ(以下, RA)の治療において, 副腎皮質糖質コルチコイド製剤(以下, ステロイド剤)は抗炎症作用に加えて, 大量では細胞性免疫能の抑制作用がみられ¹⁾²⁾³⁾, また金療法剤やメソトレキセート(Methotrexate, 以下, MTX)の作用機序は細胞性免疫能(以下, 免疫能)抑制作用ともいわれているが, 不明なことが多い⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾.

一方, 強力な活性酸素の消去酵素である Superoxide dismutase (以下, SOD) が RA などの慢性炎症において体内に増加した活性酸素を消去し, 抗リウ

マチ作用を発揮するとの仮説もある⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾. そこで抗リウマチ剤による免疫能抑制作用と, 体内における SOD 総量の指標としての血漿総 SOD 活性(以下, SOD 活性)との関連を解明する必要を考えた. 一方, 免疫能や SOD 活性では個体差や日差変動が大きいと考えられることから, 本実験では個体(ウサギ)ごとに経時的採血を行い, PHA およびリンパ球数を指標とする細胞性免疫能と, 体内における SOD の変動を反映すると考えられる血漿中の SOD 活性との関係から, 抗リウマチ剤の作用機序を考察した.

実験方法

1. 実験の概要:

日本白色家兎(6~8カ月齢の雌, 2.3~4.1kg. 以下, ウサギ) 20羽を5羽ずつの4群に分け, 対照群, ステロイド投与群, シオゾール投与群, MTX 投与群とした。3週ごとに1羽につき9mlを大腿静脈から採血し, 5mlを免疫能検査, 2mlをSOD活性検査, 2mlを全血球検査とした。1回の採血量は, ウサギを3kgとすると60kgの人では180mlに相当した。

2. ステロイド投与方法:

ステロイド剤としてPredonisolone acetateのプレドニン注(シオノギ) 12.5mg/ampを1羽につき2.5mg連日6週間筋注し, その後は同量を隔日に3週間筋注し, 半減したが, 1回投与量は, ウサギを3kgとすると60kgの人では50mgに相当した。

3. シオゾール投与方法:

筋注用金療法剤のシオゾール注(シオノギ) 10mg/ampを1羽につき2mgを週1回の12週間, 計24mg筋注した。ウサギを3kgとすると60kgの人では40mg/週, 総量480mgに相当した。

4. MTX投与方法:

メソトレキセート(レダグリー) 5mg/vialを1羽につき0.5mg週2回連日に12週間筋注したが, ウサギを3kgとすると60kgの人では20mg/週に相当した。

5. PHA細胞性免疫能検査(以下, PHA検査):

(株)SRLに外注検査した。すなわちPhytohemagglutinin (P. H. A.)によるリンパ球幼若化試験(³Hチミジン取り込み能法)で, 比重遠心法にてリンパ球を分離し, P. H. A. を分注して炭酸ガス培養した後, シンチレーションカウンターでチミジン取り込み値(cpm, 以下単位略)を算定した¹²⁾。

6. 血漿総SOD活性検査(以下, SOD活性):

(株)SRLに外注検査した。すなわち全血2mlから血漿を分離し, -80度C凍結で保存後, 解凍して検査を行った。改良亜硝酸法(nitrite法)により, xanthine oxidaseとhypoxanthineからO₂⁻(Super-oxide radical)を発生させ, 検体中のSODをO₂⁻不均化分解(dismutation)させた。残存したO₂⁻を定量し, 血漿中の総SOD活性値(U/ml, 以下単位略)を求めた¹³⁾。

7. 全血球検査:

ヘモグロビン値とヘマトクリットを測定し, 塗沫標本から白血球数と血小板数, および白血球分画(百分率)を算定した。

結果

I. 対照群

1. 細胞性免疫能

PHAは, 採血5回の総平均が20486で, 標準偏差は11648になり, 個体差が著明で, さらに同一個体においても3週ごとの変動は著明であった。したがってPHAでは個体差は大きいものの, 各個体での変動において約 2×10^4 以上の急激な増減および測定値が約 0.5×10^4 以下は, 正常範囲外値(以下, 正常外値)と考えられた。またリンパ球数においても各個体内での変動は4000に及び, 総平均5197(標準偏差1370)であったが, 測定値が約3000以下は正常外値と考えられた(図1)。

2. 体重とヘモグロビン値

成長期後半(6~7カ月齢)のウサギを用いたため, 体重は12週間で平均0.9kg漸増し, 3週ごとの標準偏差は0.05~0.56kgであった。ヘモグロビン値は個体差があり, また個体では採血ごとの変動もみられ, すなわち3週ごとの5回の採血において, 平均13.1g/dl(標準偏差1.0g/dl)であった。したがって各個体共, 体重は12週間で1kg程度漸増し, この期間における体重減少は, 対照の変動を正常範囲とすると, 正常範囲外値(以下, 正常外値)と考えた。またヘモグロビン

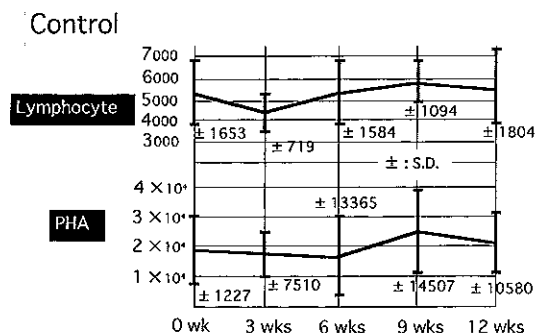


図1 対照におけるPHA(リンパ球幼若化率)とリンパ球数: PHAは, 約 2×10^4 以上の急激な増減, あるいは測定値で 0.5×10^4 以下が正常範囲外値(以下, 正常外値)であった。リンパ球数では著しい増減がみられたが, 約3000以下が正常外値であった。

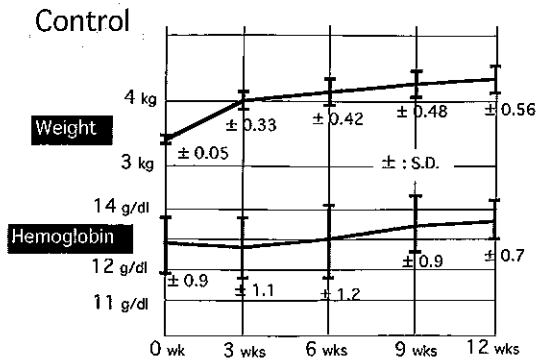


図2 対照におけるヘモグロビン値と体重：成長期（6～7カ月齢）では体重は3カ月間に約1kg漸増した。ヘモグロビン値は同一個体でも約1.0g/dl以内の変動があった。

Control

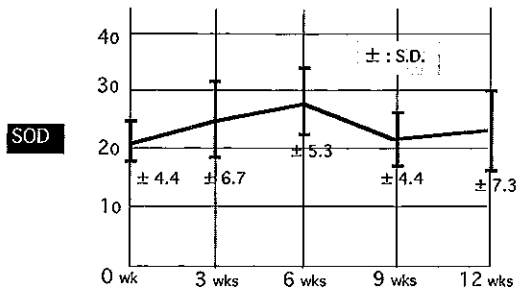


図3 対照における血漿総SOD活性：標準偏差は5.6で、約10以上の変動、あるいは測定値で約15以下が正常外値。

値は測定時に変動があるも、約1.0g/dl以上の急激な増減は正常外値と考えられた（図2）。

3. 血漿総SOD活性値

SOD活性は、採血5回の総平均が24.0で、標準偏差は5.6になり、個体差と共に、同一個体においても3週ごとに変動もみられた。したがってSOD活性では、個体差があるものの各個体での変動においては約10以上の変動は正常外値と考えられ、また測定値が約15以下も正常外値と考えられた（図3）。

II. プレドニン投与群

1. 細胞性免疫能

PHAは、プレドニン投与3週（プレドニンの連日投与開始後、3週間経過）では、5羽（No.1-5）で著減し、またリンパ球数も同時に著減し、1羽（No.3）は貧血などの免疫不全徴候を呈して死亡した。残る4羽（No.1, 2, 4, 5）は、プレドニン投与6週で、

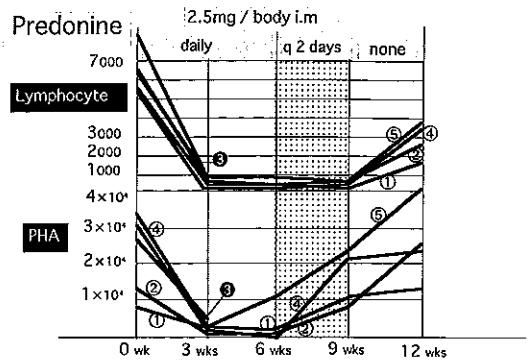


図4 プレドニン投与群におけるPHAとリンパ球数：プレドニン連日投与3週で、PHAおよびリンパ球数が著減し、黒③は貧血、脱毛などの免疫不全徴候を呈して死亡した。プレドニン隔日投与では、PHAは増加したが、リンパ球数は著減したままで、プレドニンの中止によりPHAおよびリンパ球数は反動的に著増した。

PHAおよびリンパ球数共にさらに減少した。プレドニンを隔日投与にして半減すると3週間で、PHAは反動的に増加し、プレドニン中止後も増加してほぼ開始時の値に回復したが、リンパ球数はプレドニンの半減では増加せず、プレドニン中止後に反動的に著増した。ちなみにPHAにおける 2×10^4 以上の急激な減少と測定値が 0.5×10^4 以下、およびリンパ球数における測定値が3000以下は免疫能の抑制による正常外値と考えられた（図4）。

2. 体重とヘモグロビン値

体重はプレドニン投与3週で死亡した1羽（No.3）を除いて、4羽（No.1, 2, 4, 5）では6週で軽度になんが漸減したが、プレドニン投与を半減、あるいは中止すると4羽共に漸増し、ほぼ回復した。ヘモグロビンは、プレドニン投与3週で5羽すべてで著減し、とくに死亡した1羽で11. g/dlから9. g/dlに減少した。プレドニン投与6週で2羽（No.1, 4）は軽度増加し、2羽（No.2, 5）は軽度減少したが、プレドニン半減で、前2羽は減少し、後2羽は増加した。プレドニンの中止によりヘモグロビン値は4羽共に急速に増加し、ほぼ回復した。ちなみにプレドニン投与中の体重減少は正常外値であり、その中止による体重の急激な増加も正常外値であった（図5）。

3. 血漿総SOD活性値

SODは、プレドニン投与3週で、4羽（No.1, 2, 3, 5）で減少し、その中で最も著減した1羽（No.3）

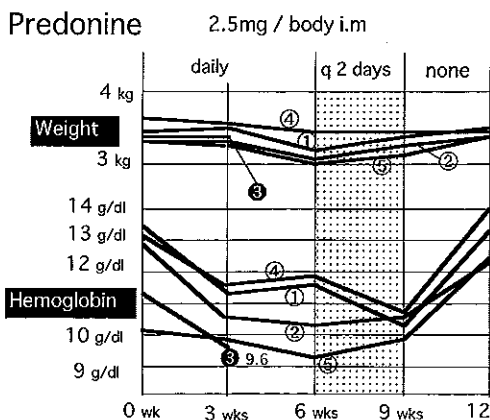


図5 プレドニン投与群におけるヘモグロビン値と体重: プレドニン連日投与で、ヘモグロビン値は著減し、体重も漸減したが、ステロイド隔日投与あるいは中止により共に回復傾向を示した。

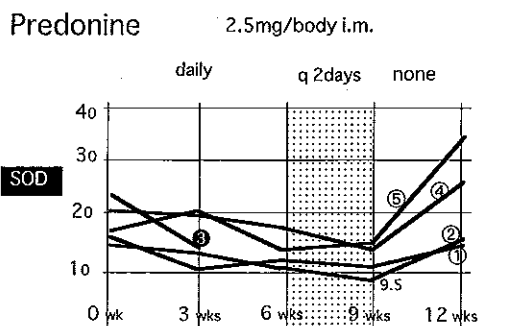


図6 プレドニン投与群における血漿総SOD活性: プレドニン連日投与および隔日投与では、SOD活性は減少傾向を示したが、プレドニンの中止により反動的に著増した。

が免疫不全で死亡した。プレドニン投与6週およびプレドニン半減投与3週(プレドニンの隔日投与で3週間)では、4羽(No.1, 2, 4, 5)におけるSODは漸減傾向を示し、プレドニンを中止すると反動的に著増し、2羽(No.4, 5)では開始時のSOD値を凌駕した。ちなみにプレドニン投与中のSODは減少幅が10以上で、測定値が15以下であり、共に正常外値であった(図6)。

Ⅲ. シオゾール投与群

1. 細胞性免疫能

シオゾール投与の6週では5羽中2羽(No.3, 5)においてPHAの著明な減少(1969, 332)がみられたが、リンパ球数の減少を伴わず、一過性で、9週日にはPHAは回復していた。これらは 2×10^4 以上の急激

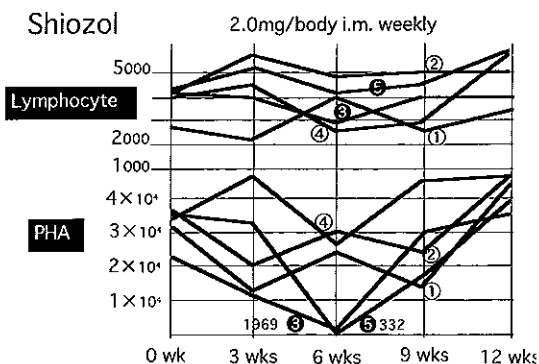


図7 シオゾール投与におけるPHAとリンパ球数: シオゾール投与6週では、5羽中2羽(黒③, ⑤)でPHAが一過性に著減したが、リンパ球数の減少を伴っていなかった。

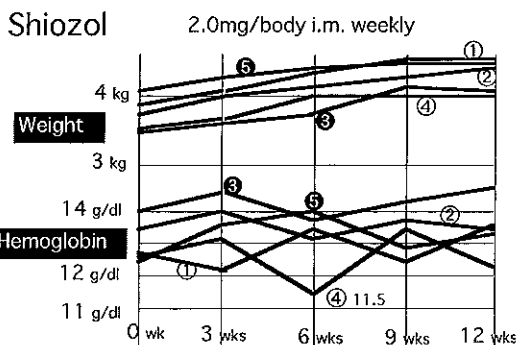


図8 シオゾール投与におけるヘモグロビン値と体重: 同2羽では、体重減少や貧血などの免疫不全徴候を伴っていなかった。

な減少と測定値が 0.5×10^4 以下から正常外値であった(図7)。

2. 体重とヘモグロビン値

2羽(No.3, 5)では、一過性のPHAの低下をきたしたが、体重減少や貧血などの免疫不全徴候を伴っていなかった(図8)。

3. 血漿総SOD活性値

シオゾール投与下のSODは著明な増減を示さず、PHAが著減した2羽(No.3, 5)でも減少傾向はみられなかった(図9)。

Ⅳ. MTX投与群

1. 細胞性免疫能

5羽中2羽(No.1, 2)においてそれぞれ9週と12週でPHAが著明に減少したが(1241, 145)、一過性で、3週間にはいずれも回復した。これら2羽中1羽(No.2)のみに一過性のリンパ球数の減少(2336)が

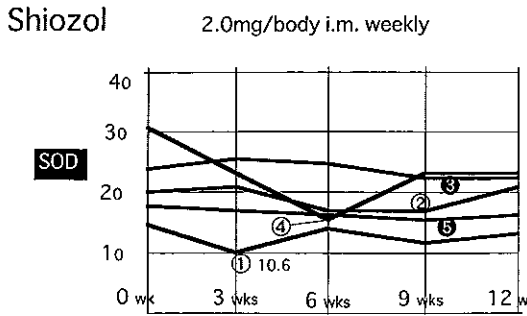


図9 シオゾール投与における血漿総SOD活性：同2羽においてもSODの正常範囲外の増加あるいは減少はみられなかった。

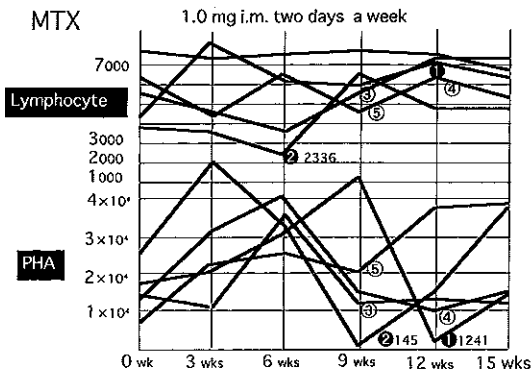


図10 MTX投与におけるPHAとリンパ球数：5羽中2羽（黒①、②）において、PHAがそれぞれ12週と9週で一過性に著減したが、1羽（黒②）のみに3週先行してリンパ球数の減少がみられた。

みられたが、PHAの減少に3週間先行していた。ちなみに2羽（No. 1, 2）においてPHAの 2×10^4 以上の急激な減少と測定値が 1.5×10^4 以下は正常外値であり、1羽（No. 1, 2）のリンパ球数は測定値が3000以下の正常外値であった（図10）。

2. 体重とヘモグロビン値

PHAが9週で著減した1羽（No. 2）では、ヘモグロビンの著明な減少（8.9g/dl）を伴っていたが、体重の減少はみられなかった。このヘモグロビンの急激な減少はPHAの減少と同時に、かつ3g/dl以上に及び、正常外値であった（図11）。

3. 血漿総SOD活性値

PHAが9週で著明に減少した1羽（No. 2）では、SOD活性においても一過性に減少（10.7）する傾向がみられ、これは測定値が15以下で、正常外値であっ

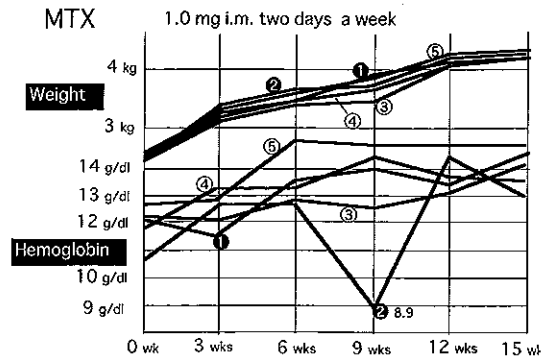


図11 MTX投与におけるヘモグロビン値と体重：同1羽では、ヘモグロビン値も9週で著減したが、体重は減少しなかった。

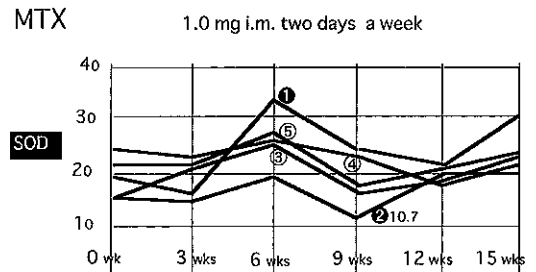


図12 MTX投与における血漿総SOD活性：同1羽では、SOD活性も9週で正常範囲以下に減少した。

た（図12）。

考 察

1. 本実験における細胞性免疫能

本実験では、PHAとリンパ球数を免疫能の指標としたが、免疫不全時にはPHAとリンパ球数は共に抑制され、または体重減少や貧血、致死なども免疫不全の傍証となった¹¹⁾。またプレドニンの隔日投与による半減では、PHAは回復傾向を示す一方、リンパ球数は1000以下に抑制された。すなわちPHAはプレドニンの量的変化に鋭敏に反応し、一方、リンパ球数はプレドニンによる抑制を強く受け、プレドニンの減量にも反応せず、PHAとやや異なる免疫反応がみられた。

2. 本実験における血漿総SOD活性（SOD活性）

本実験のSOD活性は、血漿中のSODそのものを同定し、定量するものではないが、不活性のSODを拾うことがない特徴があり¹³⁾、また血漿における経時的な活性値の変動は、体内の総SOD活性値を反映して

いると考えられる。また赤血球中のSODは血漿中のSODの100倍にも及ぶため、溶血させないこと、採血直後に血球を分離することが必要であったが、対照での採血5回の平均SOD活性は21.08～28.6で、標準偏差は4.4～7.3であり、抗リウマチ剤投与下における個体ごとの経時的評価が可能と思われた。またプレドニン投与時のSOD活性の減少、および投与後のSOD活性の増加は、いずれの個体も同様に反応し、むしろ対照以上に標準偏差は少なく、信憑性のある知見と考えられた。

3. ステロイド投与における免疫能抑制作用と血漿総SOD活性(SOD活性)

ステロイドは組織レベルで炎症などで発生した活性酸素を抑える働きがあるが¹³⁾、活性酸素が体内に多く発生すると考えられている高気圧酸素療法では、ステロイドはむしろその副作用である酸素中毒や免疫能抑制作用を増強する働きもあり¹⁶⁾¹⁷⁾、ステロイドの活性酸素に対する作用機序は不明なことが多い。また体内にくまなく分布するSOD自身が抗炎症作用を有することから⁹⁾、当初はステロイドにより免疫能が抑制されると、体内のSOD活性が増加し、抗リウマチ作用を発揮するのではないかと考えた。しかし本実験では、むしろ免疫能の低下と共にSOD活性も低下したことから、おそらくステロイドの抗炎症作用により体内の活性酸素が減少したためと考えられた。またステロイド投与の中断で、SODが反動的に増加したことから、SODの抗炎症作用が発揮され得ることが推測され、ステロイドのパルス療法の一つの作用機序とも考えられた。一方、本実験では正常のウサギを用いたため、RAの病態とは本質的に異なっていたが、正常なウサギにおいても活性酸素は常に発生していることから、ステロイド投与によりその発生が抑制されると、SOD活性も低下することが考えられ、RAにおいてはステロイド投与とSOD活性の関連がより明瞭になる可能性も示唆された。

4. シオゾール免疫能抑制作用と血漿総SOD活性(SOD活性)

金製剤のRAに対する作用機序として細胞性免疫能抑制作用が報告され⁹⁾³⁾¹⁸⁾、またRAにおけるSODやCu-thioneinなどの抗酸化物質との関連を示唆する報告もある⁹⁾。

シオゾール投与では、5羽中2羽においてPHAが著明に減少したが、いずれも体重減少や貧血などの免疫不全徴候を伴わず、SOD活性に変化はみられなかった。したがってある種の免疫抑制反応を示唆するものであったが、ステロイド投与における免疫抑制作用とはかなり異なっていた。

5. MTXにおける免疫能抑制作用と血漿総SOD活性(SOD活性)

MTXの作用機序に関しては免疫能抑制作用とされているが⁷⁾、サイトカインを介する抗炎症作用との報告もあり⁸⁾、またMTXはRA患者の白血球における活性酸素の発生を抑制するとの報告もある¹⁹⁾。

MTX投与では、5羽中2羽に、一過性の免疫能の低下がみられ、内1羽では、3週先行するリンパ球数の減少、あるいは同時にみられたヘモグロビン値の激減、SOD活性の減少から、免疫能抑制作用と考えられた。しかしMTX投与では免疫能抑制作用が一過性で、かつ全ての個体でみられないことが、免疫調節剤としてのMTXの作用機序の特徴であるかもしれない。

ま と め

1. ウサギ5羽/群に、プレドニン、シオゾール、MTXを投与し、細胞性免疫能の指標としてPHA、および体内のSOD(活性酸素消去酵素)量の指標として血漿総SOD活性を3週ごとに測定し、免疫不全との関連をみた。
2. プレドニンの人50mg/日、相当では、PHAの著明な抑制とSOD活性の低下がみられ、プレドニンの中止によりSOD活性は反動的に増加した。
3. シオゾールの人40mg/週、相当ではいずれも5羽中2羽において、PHAの一過性の減少がみられたが、SOD活性の著明な変化はなかった。
4. MTXの人20mg/週、相当では5羽中2羽においてPHAの一過性の減少がみられ、内1羽ではリンパ球数の減少、貧血に加えて、SOD活性の低下がみられた。

参 考 文 献

- 1) 大澤伸昭：副腎皮質ステロイド剤の作用と使い方。ライフサイエンス・メディカ、東京。1-73, 1994。
- 2) 広畑俊成：リウマチの薬物療法 - ステロイドの

- 使い方. *MB Orthop.*, 11: 33-39, 1998.
- 3) 槇野茂樹, 大澤仲昭: 新・副腎皮質ステロイド剤の作用と使い方. ステロイド剤の副作用とその対策. 大澤仲昭編, ライフサイエンス・メディカ社発行, 東京. 31-38, 1994.
 - 4) 浜井貴人, 根岸雅夫, 高橋昭三: 運動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.
 - 5) Russell AS, Davis P and Miller C.: The effect of a new antirheumatic drug, triethylphosphine gold (Auranofin), on in-vitro lymphocyte and monocyte cyto-toxicity. *J. Rheumatol* 9: 30-35, 1982.
 - 6) Ralf Miesel and Margit Zuber.: Copperdependent antioxidase defenses in inflammatory and auto-immune rhematic diseases. *Infeammation*, 17: 283-294, 1993.
 - 7) T. C. Wascher, J. Hermann, and H. P. Brezinschek.: Cell-type specific response of peripheral blood lymphocytes to methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.*, 72: 535-540, 1994.
 - 8) A. Constantin, P. Loubet, and N. Lambert.: Antiinflammatory and immunoregulatory action of methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 41: 48-57, 1998.
 - 9) Huber, W.: Orgotein. *Clin. Rheum. Dis.*, 6: 465-498, 1980.
 - 10) 金田博史: RA 患者に対する SOD 関節内注入. *整形外科基礎科学*. 10: 275-278, 1983.
 - 11) 鎌田俊之: 慢性関節リウマチ患者における Superoxide Dismutase および高気圧酸素療法に関する研究. *日整会誌*. 59: 17-26, 1985.
 - 12) 笠原忠, 伊藤喜久: 細胞培養試験と分裂促進物質. *臨床検査*. 23: 660-667, 1979.
 - 13) 大柳善彦: Establishment of nitrite-kit for SOD activity determination. SOD 活性測定亜硝酸法とそのキット化. *炎症*, 4: 63-73, 1984.
 - 14) 井上治, 新垣宜貞, 半澤浩明ほか: 長期の高気圧酸素療法が免疫能に及ぼす効果に関する実験および臨床. *日高圧医誌*. 31: 119-128, 1996.
 - 15) 内田詔爾: リウマチの薬物療法 - DMARDs の使い方 -. *MB Orthop.*, 11: 41-47, 1998.
 - 16) K. K. Jain.: Textbook of hyperbaric medicine. Hogrefe & Huber Publishers. Toront, 106-135, 1990.
 - 17) O. Inoue.: Effective cellular immuno-suppression in relation to plasma total superoxide dismutase (S. O. D.) activity by HBO with predonisolone in rabbits. The 13th International Congress on Hype rbaric Medicine in Kobe. Abstracts, 1999.
 - 18) 荻田善一, 大浦彦吉編. 活性酸素 - その臨床医学への応用 -. 共立出版, 東京 71-83, 1987.
 - 19) I. Laurindo, S. Mello, and W. Cossermelli.: Influence of low doses of methotrxtate on superoxide anion production by polymorphonuclear leukocytes from patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 22: 633-638, 1995.