

慢性関節リウマチとT-リンパ球

——末梢血，関節液中の分布と免疫抑制剤の およぼす影響について——

時 岡 正 明*・高 杉 潔

岡山大学温泉研究所 温泉内科学部門
岡山大学医学部附属病院 三朝分院内科
(主任：森永 寛教授)
(1977年12月27日受付)

1. 緒 言

慢性関節リウマチ(RA)患者の滑膜組織像で、その診断上、特に特異的なものはないとされてはいるものの、リンパ球・形質細胞といった単核細胞による高度の細胞浸潤をよく認める(ZIFF, 1974)。一方、RA患者関節液中では、特にその炎症の極期において出現して来る大多数の細胞は好中球であって、リンパ球を含めていわゆる単核細胞の数は甚だ少なく(HOLLANDER and McCARTY, 1972; TAKASUGI and HOLLINGSWORTH, 1967)。そのためかこれら少数の細胞はともすれば看過されがちなのであるが、滑膜というリウマトイドの炎症の場に由来するこれらの「関節液中の少数の単核細胞群」を追究して行くことは、RAの病因・病態解析の上で重要な手掛りを与えてくれる大きな可能性を秘めていると言えよう。

我々は、この数少ないRA患者関節液中の単核細胞の分離をまず試み、更にその機能をみる一助として、ヒツジ赤血球ロゼット形成リンパ球(SRBC-RFC)、すなわちT細胞(LAY *et al.*, 1971; JONDAL *et al.*, 1972)の検索をおこなった。同時に正常人およびRA患者末梢血由来のものとの比較を行い、あわせて治療薬として用いられた cyclophosphamide の影響も検討したのでここに報告する。

2. 方 法

(1) 関節液および末梢血よりの単核細胞の分離の方法。

RA患者の主として膝関節よりヘパリン加注射器を用いて関節液を採取し、これにヒアルロニダーゼ(スプラーゼ®, 持田製薬)を10~20単位/ml(関節液)となるように加えて室温に20分間放置した後、あらかじめ16×100mmのサイズの試験管に入れておいた3mlのFicoll-

sodium metrizoate (Lymphoprep®)上に静かに重層する。直ちに400gで40分間スウィング型のローターで遠沈し、下層のLymphoprep液の直上に形成された白濁リング層をパスツール・ピペットを用いて採取し、ゼラチン・ペロナール緩衝液で3回洗滌した後、これのMay-Giemsa染色塗沫標本を作成し、これと分離前の全関節液細胞の分類用塗沫標本とを比較して、リンパ球、単球系細胞の比率の動きを算定した。

末梢血よりの単核細胞の分離にさいしても関節液の場合にほぼ準じておこなった。すなわち、ヘパリン加注射器を用いて採取した血液を生理的食塩水で2倍に稀釈したのち、Ficoll-sodium metrizoateを用いて遠沈分離し、分離前後のリンパ球、単球系細胞の動きを同様の方法を用いて算定した。なお、分離用試験管1本につき関節液6ml、血液3mlをおのおの使用することを原則としたが、細胞数の比較が少ない(3,000/mm³以下)関節液では、最大限10mlまでを使用した。

(2) SRBC-RFC(Tリンパ球)の観察方法

SRBC-RFC、すなわちT細胞の観察は矢田と橋(1972)の方法に準じておこなった。

使用したヒツジ赤血球は、ヒツジより採血後ただちに脱線維素処理をおこない、ついで等量のAlsever保存液を加えて4℃に貯蔵し、実験には採取後2週間以内のものを供した。保存ヒツジ赤血球はその使用直前に生理的食塩水で3回洗滌をくり返した後、ウシ胎児血清中に1.0×10⁸/mlの濃度となるように浮遊した。また、分離された単核細胞は5×10⁶/mlの濃度にウシ胎児血清中に加えられた。

このようにして得られたヒツジ赤血球浮遊液、単核細胞浮遊液の各0.2mlずつをとり、小試験管内にてよく混和した後、37℃の恒温槽中で15分間インキュベートし、ついで1000rpmで5分間遠沈してから氷中にて1

* 現在は、岡山大学医学部第二内科学教室に所属中。

時間放置した。以上の操作をおえてから小試験管を取り出し管底の細胞を毛細管ピペットでゆっくりと再浮遊させ、その1滴をスライドガラス上にとってカバーガラスをかけたパラフィン封入後、顕微鏡下に観察して有核細胞500個を数え、3個以上のヒツジ赤血球と結合しているものを陽性と判定した。

3. 結 果

(i) 関節液および末梢血よりの単核細胞の分離について

RA患者16名、31関節より得られた関節液において、分離前の全関節液の細胞分類においては、リンパ球 $20.3 \pm 15.1\%$ 、単球系細胞 $15.1 \pm 7.2\%$ 、多核白血球 $64.6 \pm 17.3\%$ であり、すべての単核細胞中に占めるリンパ球の割合は $53.1 \pm 15.7\%$ であった。これに反して、分離後の分類上では、リンパ球 $60.7 \pm 19.6\%$ 、単球系細胞 $36.1 \pm 19.6\%$ と圧倒的に単核細胞群が多く、僅かに $3.2 \pm 3.8\%$ の多核白血球によるコンタミネーションを認めるだけであった。また、すべての単核細胞に対するリンパ球の比率は $62.4 \pm 19.8\%$ と分離前に比較して少しばかり増加する傾向にあった。

図1は関節液中における分離前・後におけるリンパ球の単核細胞に対する比率をあらわしたものである。破線で示した $y=x$ より大きく右下方にはみ出した2例を除いたほかの大部分において分離後のリンパ球数の比率が少し上昇していることがわかる。分離前の関節液中にしばしば認められる大型の滑膜表層細胞と思われるもの(写真1)は、この実験条件での遠沈分離後には管底に

落ちて行くようで、分離された単核細胞群からはほぼ完全に消失していた。また、分離後に認められた多核白血球のほとんどは、写真2に示したような変性した好中球であった。

一方、正常人11名、RA患者27名より得られた末梢血38例においては、分離前の細胞分類でリンパ球 $22.0 \pm 8.7\%$ 、単球系細胞 $8.1 \pm 3.9\%$ 、多核白血球 $69.9 \pm 9.7\%$

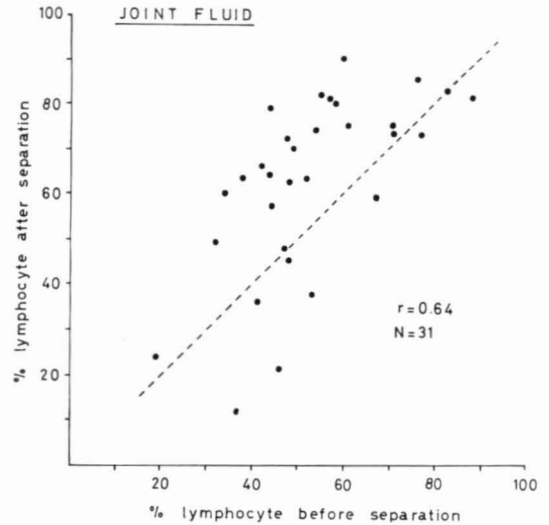


図1. RA患者関節液中において、リンパ球の全単核細胞中に占める比率を、単核細胞群の比重遠沈法による分離前・分離後に分けて示したものである。

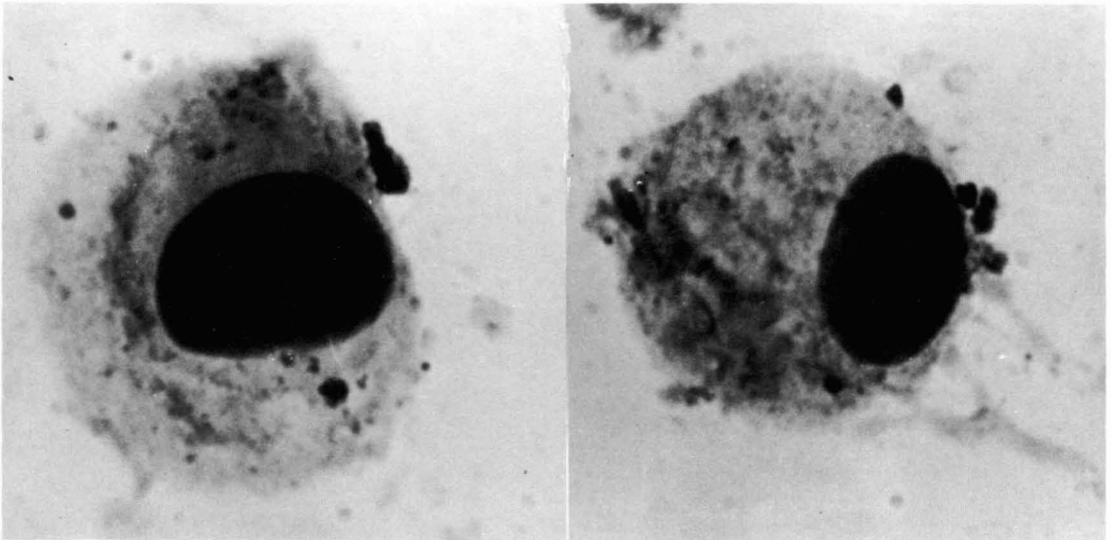


写真1. a) b) RA患者関節液中にみとめられる大型の単核細胞。おそらく滑膜表層細胞であろうと考えられる。(May-Giemsa染色)

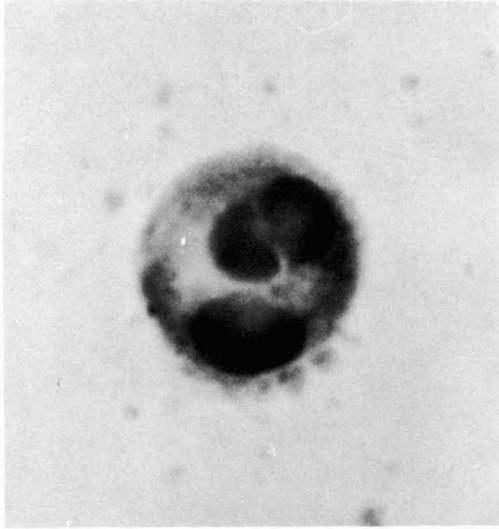


写真 2. 比重遠沈法によって分離された単核細胞群中に混入している多核白血球。変性した好中球と思われる。(May-Giemsa 染色)

となり、すべての単核細胞中に占めるリンパ球の比率は $72.7 \pm 11.6\%$ であった。分離後においては、リンパ球 $71.3 \pm 12.3\%$ 、単球系細胞 $27.7 \pm 11.6\%$ 、多核白血球 $1.0 \pm 2.0\%$ であり、すべての単核細胞に対するリンパ球の比率は $72.0 \pm 11.7\%$ であった。末梢血における分離前、分離後のリンパ球の単核細胞中に占める比率の動きをあらわしたのが図2である。

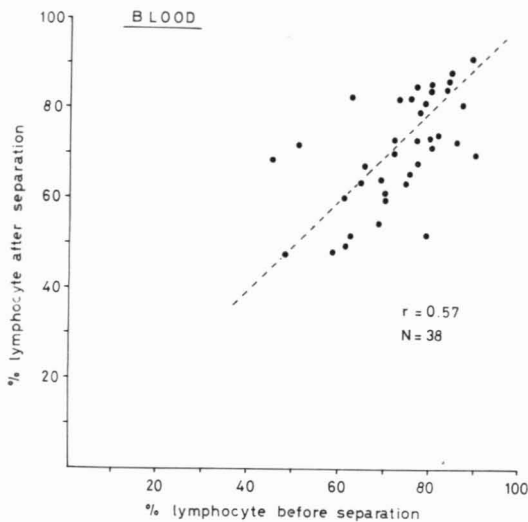


図 2. 末梢血中における単核細胞群中のリンパ球の比率を、比重遠沈法による分離前・分離後にわけて図示したものである。

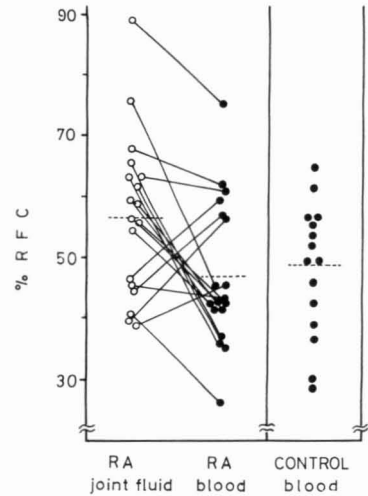


図 3. RA 患者関節液およびそれに対応する末梢血、ならびに正常人末梢血中のリンパ球のうちで、T細胞 (RFC) の占める割合を%で示した。破線は各群の平均値に相当する。

(2) SRBC-RFC (T細胞) の頻度について

SRBC-RFC は正常人15例の末梢血、definite 以上の RA 患者13名より同時に採取された末梢血および関節液18組について検索した。なお、RA 患者については、副腎皮質ホルモンや免疫抑制剤服用中の者および2週間以内に副腎皮質ホルモンの関節内投与を受けた者はこの検討対象から除外した。

図3に示すように、正常人15例の末梢血では SRBC-RFC は $48.1 \pm 11.4\%$ であり、RA患者の $47.1 \pm 12.2\%$ という末梢血中のそれとの間には有意の差を認めなかった。

一方、RA 患者関節液中の値は $56.6 \pm 13.5\%$ と、対応する末梢血中の頻度よりも明らかに高く、推計学的にその p 値は0.01~0.05 の間にあり、この関節液中の SRBC-RFC の増加は有意のものと考えられた。なお、末梢血・関節液中の SRBC-RFC と血清中のリウマトイド因子、CRP、血沈値ならびに関節液中の細胞数などの相関について詳しく追究してみたが、特記すべき結果を得ることが出来なかった。また、臨床症状、とくに関節点数との間にも何ら相関を確認することが出来なかった。

4. 考 察

免疫学の近年におけるめざましい進歩ともなっていて、かつてはそのサイズによってのみ形態学的に大・中・小と弁別されていたリンパ球が、今日ではその免疫学的機

能によりT細胞とB細胞に区別して理解され得るようになった。すなわち、前者のT細胞は腫瘍免疫、移植免疫あるいは遅延型免疫反応などといった細胞性免疫の担い手であり、一方のB細胞は液性抗体の産生にたずさわりの、形質細胞の前駆細胞であるとされている。T細胞はまた、suppressor T細胞としてB細胞の機能である抗体産生を調節し、あるいは helper T細胞として抗体産生のための情報をB細胞に伝えるなど、両細胞間の相関も次第に明確にされつつある。

このT、B両細胞をおのおのの分別する方法も次第に日常的に施行されるようになり、T細胞はヒツジ赤血球によるロゼット形成(SRBC-RFC)(Lay *et al.*, 1971; JONDAL *et al.*, 1972)、B細胞はその細胞膜表面に、免疫グロブリン・活性化された補体第3成分に対するレセプター(矢田と橘, 1972; PAPANICHAEL *et al.*, 1971; BIANCO *et al.*, 1970)・Fcに対するレセプター(MILLER *et al.*, 1971; EDEN *et al.*, 1973)などの存在することなどと言った特徴を用いて確認されている。

これらの細胞を観察するためには、先ず何よりもこれらを分離しなければならないが、末梢血よりリンパ球を主とした単核細胞群を得る方法としては、比重遠沈法がもっとも普遍的に用いられているようである。この研究において採用したB ϕ yumによる(B ϕ yum, 1968) Ficoll-sodium metrizoate (Lymphoprep[®]) 混合液の使用もその一法であり、同液の有する赤血球凝集能と相まって、特別な混合比(5.6w/v%Ficoll : 9.6w/v Sodium metrizoate)によってもたらされた1.077と言う比重が、単核細胞群を赤血球・好中球を主とした多核白血球より弁別する上で大きな要因となっている。事実、本法を用いての血液からの分離に際しては、全単核細胞に対するリンパ球の比率は、すでに述べたように分離前 72.7 \pm 11.6%, 分離後 72.0 \pm 11.7% とほぼ全く差がみとめられず、本法によって単核細胞群がその subpopulation を乱されることなく分離されていることを示している。

関節液内に浮遊しているリンパ球の分離には、本法を使用するにあたって少し問題があるようである。すなわち、関節液には多量の高分子複合体であるところのヒアルロン酸蛋白複合体が存在しているために、同液はきわめて粘稠で、原法通りの遠心法では多数の細胞が上清部とも言うべき場所にトラップされ、その上、わずかに形成された分離液上の白濁したリングも、その粘稠さのために容易に採取出来ないという大きな制約が存在していたわけである。これは、市販のヒアルロニダーゼで関節液を採取後まず処理することによって解決し得たが同酵素がリンパ球細胞膜に何らかの影響をおよぼし、ひいて

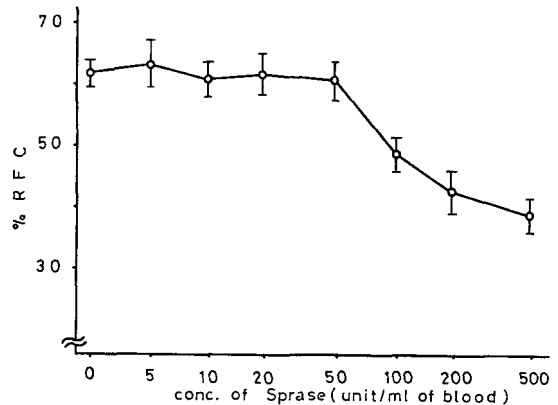


図4. ヒアルロニダーゼ(Sprase)がリンパ球表面におよぼす影響を示したもの。同一正常人末梢血を異った機会に5度にわたって検索した結果、本実験に用いた10~20u/mlの濃度ではまずヒアルロニダーゼの影響は無視出来ると考えられた。

はSRBC-RFCの頻度に影響する可能性も否定出来ない。同一正常人を用いて早朝空腹時、異った機会に5度にわたって採血し、さまざまな濃度に調整されたヒアルロニダーゼ液を添加してその影響を検討してみたが、図4に示すように、本研究で用いた10~20単位/mlという濃度ではまったくRFCの数の上で無添加群との間に差を認め得ず、まず問題ないものと考えられた。

ただ、末梢血に比較して関節液では分離後のリンパ球の比率が明らかに上昇傾向を示しているが、これは関節液中に末梢血には見られない滑膜表層細胞とかマクロファージと言ったきわめて大型の細胞が存在しており(写真1参照)、これらが分離過程において管底に沈下して行き、ために分離操作終了後において全単核細胞中に占めるリンパ球の比率が見かけ上、増加してきたためと解される。

RAにおいてその病因あるいは炎症機転の成立を解明する目的で、T細胞・B細胞の検索がすすめられ、かなりの数の報告がみられるが、結果は必ずしも一致していないようである。KEITHら(1973)、MICHELIら(1974)、VERNON-ROBERTSら(1974)、SHELDONら(1974)の報告によれば、RA患者末梢血におけるT細胞・B細胞の比率は正常人のそれと比較して差が認められないとしている。筆者らの検索結果でも、RA患者末梢血と正常人末梢血との間にはT細胞の比率上、差が存在していなかった。一方、MELLBYEら(1972)はRA患者末梢血においてB細胞の減少が認められるとし、Frølandら¹⁷⁾はT細胞の増加がみられると報告している。また、

WILLIAMS ら (1973) は活動期のRA末梢血においてT細胞の減少が認められたとしている。我々も、リウマトイド因子の titer, CRP, 血沈値, 関節点数などと末梢血中のT細胞の比率との相関の有無を検討してみたが、特に関連はみとめられなかった。

一方, RA 患者関節液に由来するリンパ球の, T細胞・B細胞の比率についての報告は, その末梢血の場合に較べて若干, 数が少ないようである。WINCHESTER ら (1973), および MCGILL (1973) は, 末梢血と比較して関節液中のT細胞の比率には差はないとしているが, 著者らの述べているように関節液中のT細胞が末梢血のそれに較べて比率上, 有意に増加しているとするものは, 既述した VERNON-ROBERTS ら (1974), SHELDON ら (1974), FRÉLAND ら (1973) の報告を数えることが出来る。

滑膜切除術によって得られたRA滑膜自体よりリンパ球を分離し (Van BOXEL and PAGET, 1975), あるいは切除した滑膜を培養し24時間以内に培養液中に出現したリンパ球を採って (LOEWI *et al.*, 1975), そのヒツジ赤血球によるロゼット形成能を検討した結果, RAの滑膜に浸潤しているリンパ球の大多数はT細胞であると断定している最近の報告に接し, 関節液内の所見が滑膜炎の反映であると考えられるだけに, 関節液中におけるT細胞の増加はその裏付けを有しているものと思われるし, RAの炎症機転になんらかの形でこの細胞が関与し, 大きな役割を有していることを疑わしめる。

しかし, その反面では, RA 患者は非常に活動性の強い時期から, 炎症々状がほとんど消滅し変形性関節炎様の症状だけを示すものまで, 実に多種多様の病像を呈しており, このようなものをすべて一括して評価することには大きな問題があるように思われる。

参考までに, ここで2症例ではあるが cyclophosphamide (CP) による治療を受けている患者について, 末梢血・関節液中のT細胞を経時的に観察し得た結果について簡単に触れてみたい。

症例 1. 50才 男子 (図5)。発病以来7年を経過した classical RA で, 入院時は両股関節の疼痛, 両膝関節の腫脹・疼痛が強く歩行困難な状態であった。入院後, 金療法・理学療法 (プール浴も含む) などにより歩行も可能となり, 臨床症状は著明に改善したが, 金製剤による頑固なヒフ炎を繰り返したため同剤を中止。50~100mg/日の CP の投与に切りかえたが, 図5に示すように CP の投与開始と共に, 末梢血・関節液中のリンパ球の絶対数およびT細胞の著明な減少を認めるものの, T細胞の全リンパ球に占める割合にはあまり大きな変動を認めていない。なお, CP 投与が総量 5,800mg に達

50 y/o male (60 kg)

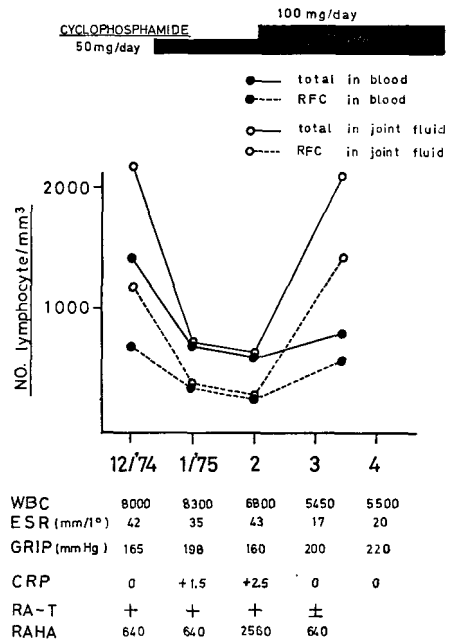


図5. 症例1の関節液, 末梢血中のT細胞の推移を主な臨床検査所見とともに示す。Cyclophosphamide の投与で両体液中のT細胞とも著明に減少しているが総投与量 5,800mg の頃に, 特に関節液中において同細胞の甚だしいリバウンドをみとめた。

した時点で関節液中のT細胞が末梢血に比較して著明に増加していることが認められたが, 臨床面では全く良好な経過を維持していた。本患者はその後, 岡山大学医学部附属病院整形外科に転じ, 左股関節・右膝関節の人工関節全置換術をうけ, CP も中止した終元気に日常生活に復帰している由で, 以後のT細胞の検索は行い得ないままとなっている。

症例 2. 68才 女子 (図6)。発病後3年を経過した classical RA で, 入院時には特に両膝関節に腫脹・疼痛・熱感が著しく, 歩行は非常に困難な状態であった。本院に入院する以前には, 毎日プレドニゾン 5mg を内服し1週に1度の割合で, 副腎皮質ホルモンの関節内注入を受けていた。本院入院後, 金製剤の投与を開始したが, 赤血球円柱の出現をみとめたため同剤を中止し, CP を50~75mg/日という量で連日投与したところ, 両膝関節の腫脹・熱感をほとんど認めなくなり, わずかに骨変形によると思われる疼痛のみを訴えるだけとなり, 杖を用いての歩行も可能となった。図6に見られるように, CP 投与開始と共に末梢血中ではリンパ球

68y/o female (47 kg)

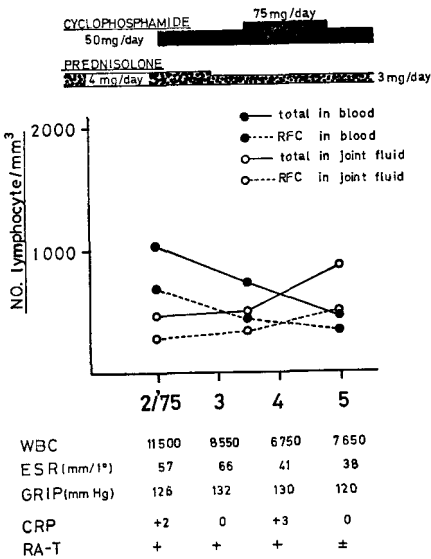


図 6. 症例 2 のおもな臨床検査所見, 治療の推移とともに, 関節液, 末梢血中の T 細胞の動きをあわせて図示している. 症例 1 ほど極端ではないが, 矢張り本例でも Cyclophosphamide 投与中にも拘らず, 関節液中の T 細胞数のリバウンド現象をみとめている.

数, T 細胞数ともに著明な減少傾向を示しているが, 他方, 関節液においてはそれらの数値にあまり大きな変化が認められず, 総量 4,800mg の時点では全身状態, 関節症状で良好な状態の俣であるにも拘らず, リンパ球・T 細胞共に増加傾向を示していた.

CP の RA に対する臨床的効果は Fosdick ら (1968), アメリカリウマチ協会 (1970) の CCC controlled study, 高杉 (1973) らの詳細な報告があるとは言えるものの, その作用機作については完全に究明されているとは言えないようである.

Clements ら (1974), Hurd ら (1975) によれば RA の末梢血において T 細胞, B 細胞両者の絶対数が減少し, 体液性免疫・細胞性免疫ともに抑制されるという現象が CP の投与によって認められるという. Horwitz (1974) は同剤の投与により T 細胞, B 細胞ともに減少するが, 特に B 細胞が早期においてより大きな影響を蒙り, そのために液性抗体の産生が抑制されると報告している.

先に述べた如く, 我々の検索した PA 患者 2 症例においても CP の投与により末梢血においてはリンパ球数, T 細胞数ともに著明な減少傾向を示しており, また Hurd ら (1975) の指摘するように経過中その両方の数におい

でのリバウンドを症例 1 の方ではみとめている. しかし, 関節液中においては両症例共に CP の投与総量が 5,000 mg 前後となった時点で, このリバウンドを著明に認め, 末梢血中のリンパ球の態度と少し異っているようである. この所見の意義づけは現在のところでは試み得ていないが, 末梢血中および関節液中あるいは滑膜自体中のリンパ球間の相関を追究していく上で興味ある方向を示唆しているものと言えよう.

5. 結 語

RA 患者関節液中にみられる単核細胞, そのなかでも特にリンパ球の分離を試み, 更にその機能を見る一助として SRBC-RFC, すなわち T 細胞の検索を行ない, 同時に正常人および RA 患者末梢血由来のものとの比較・検討を試みた.

その結果

1. RA 患者関節液をヒアルロニダーゼ処理することによって, 末梢血の際と同様に Ficoll-sodium metrizoate を用いた比重遠沈法により, 単核細胞群をその subpopulation に大きな影響を与えることなく, しかも簡単に分離することが出来た.

2. RA 患者関節液中の T 細胞の比率は, 対応する末梢血中のそれと比較して明らかに有意の増加を示した. しかし, RA 患者末梢血中の T 細胞の比率は正常人の末梢血中のものとほぼ同一で, 両者間には有意の差を認めなかった.

3. Cyclophosphamide による治療をうけている RA 患者においては, その薬剤の投与により投薬開始前に較べて末梢血・関節液中のリンパ球, T 細胞数ともに明らかな減少傾向を示しているが, この傾向は常に存続しているとは限らず, 本論で報告した 2 例共に Cyclophosphamide 総量 5,000mg, 前後において, 特に関節液中のリンパ球数, T 細胞数ともに著しいリバウンドを示した.

などの知見を得ることが出来た.

本論文の要旨は第 19 回日本リウマチ学会総会 (京都, 1975) で発表した. また, 厚生省の特定疾患「悪性関節リウマチ・結節性動脈周囲炎」研究班の疫学部門部長岡山大学医学部整形外科児玉俊夫教授の御好意により本研究に要した費用の一部は同班々費よりの援助によった事を記して感謝の意を表したい.

文 献

BIANCO C. *et al.* (1970) : A population of lymphocytes bearing a membrane receptor for

- antigen-antibody complement complexes. I. Separation and characterization. *J. Exp. Med.* **132** : 702-720.
- BΦYUM A. (1968) : Separation of leucocytes from blood and bone marrow. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* **97**, 31-50.
- CLEMENTS PJ *et al.* (1974) : Effects of cyclophosphamide on B- and T-lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **17** : 347-353.
- Cooperating clinics committee of the American Rheumatism Association (1970) : A controlled trial of cyclophosphamide in rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* **283** : 883-889.
- EDEN A. *et al.* (1973) : Mechanism of binding of soluble immune complex to lymphocytes. *Cell Immunol.* **7** : 459-473.
- FOSDICK W. M. *et al.* (1968) : Long-term cyclophosphamide therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **11** : 151-161.
- FRϕLAND S. S. *et al.* (1973) : Immunological characterization of lymphocytes in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *Scand. J. Immunol.* **2** : 67-74.
- HOLLANDER J. L. & McCARTY D. J. (1972) : The study of synovial fluid, Chap. 6. Arthritis and allied conditions. Philadelphia, Lea & Febiger.
- HORWITZ D. A. (1974) : Selective depletion of Ig-bearing lymphocytes by cyclophosphamide in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **17** : 363-374.
- HURD E. R. & GIULIANO V. J. (1975) : The effect of cyclophosphamide on B and T lymphocytes in patients with connective tissue diseases. *Arthritis Rheum.* **18** : 67-75.
- JONDAL M. *et al.* (1972) : Surface markers on human T and B lymphocytes. I. A large population of lymphocytes forming nonimmune rosettes with sheep red blood cells. *J. Exp. Med.* **136** : 207-215.
- KEITH H. I. & CURREY H. L. F. (1973) : Rosette formation by peripheral blood lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Ann. rheum. Dis.* **32** : 202-207.
- LAY W. H. *et al.* (1971) : Binding of sheep red blood cells to a large population of human lymphocytes. *Nature* (London) **230** : 531-532.
- LOEWI G. *et al.* (1975) : Study of lymphoid cells from inflamed synovial membranes. *Ann. rheum. Dis.* **34** : 524-528.
- McGILL P. E. (1973) : Rheumatoid lymphocytes. *Lancet* **ii** : 1266.
- MELLBYE O. J. *et al.* (1972) : Immunoglobulin and receptors for C3 on lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **15** : 371-380.
- MICHELI A. & BRON J. (1974) : Studies on blood T and B lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Ann. rheum. Dis.* **33** : 435-436.
- MILLER J. F. *et al.* (1971) : Interaction between lymphocytes in immune response. *Cell Immunol.* **2** : 469-495.
- PAPAMICHAIL M. *et al.* (1971) : Immunoglobulins on the surface of human lymphocytes. *Lancet* **ii** : 850-852.
- SHELDON P. J. *et al.* (1974) : Studies on synovial fluid lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Ann. rheum. Dis.* **33** : 509-514.
- TAKASUGI K & HOLLINGSWORTH J. W. (1967) : Morphologic studies of mononuclear cells of human synovial fluid. *Arthritis Rheum.* **10** : 495-501.
- 高杉 潔 (1973) : 慢性関節リウマチの免疫抑制剤療法, 特に Cyclophosphamide による治療に関して. リウマチ **13** : 374-376.
- VAN BOXEL J. A. & PAGET S. A. (1975) : Predominantly T-cell infiltrate in rheumatoid synovial membranes. *N. Engl. J. Med.* **293** : 517-520.
- VERNON-ROBERTS B. *et al.* (1974) : T and B cells in the blood and synovial fluid of rheumatoid patients. *Ann. rheum. Dis.* **33** : 430-434.
- WILLIAMS R. C. *et al.* (1973) : Studies of T- and B-lymphocytes in patients with connective tissue diseases. *J. Clin. Invest.* **52** : 283-295.
- WINCHESTER R. J. *et al.* (1973) : Alteration in the proportion of B and T lymphocytes in rheumatoid arthritis joint fluids with low complement and increased complexes. *Arthritis Rheum.* (abstr) **16** : 138.
- 矢田純一, 橘 武彦 (1972) : ヒトリンパ球 subpopulation の分別. 免疫実験操作法 (II) p. 473-475.

日本免疫学会編

ZIFFM. (1974) : Relation of cellular infiltration of rheumatoid synovial membrane to its immune response. *Arthritis Rheum.* 17 : 313-319.

ENUMERATION OF T-CELLS IN PERIPHERAL BLOOD AS WELL AS IN JOINT FLUID FROM PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS (RA) AND THE EFFECT OF CYCLOPHOSPHAMIDE

by Masaaki TOKIOKA M. D. and Kiyoshi TAKASUGI M.D., D. Med. Sci. *Institute for Thermal Spring Research & Okayama University Hospital Misasa Branch*

Abstract Gradient centrifugation was quite useful in obtaining "mononuclear" cell fractions from synovial fluids derived from patients with rheumatoid arthritis. The ratio of lymphocytes to monocytoïd cells was similar to that seen in peripheral blood. Prior treatment of the fluid with hyaluronidase was found to be necessary to obtain a satisfactory yield of the cells.

Sheep erythrocyte rosette-forming lymphocytes (T-cells) were studied in 18 paired samples of synovial fluid and blood in RA and 15 control blood samples from normal persons were also examined. In the paired synovial fluid and blood samples from the RA patients, the mean percentages of the T-cells were 56.6 and 47.1 respectively and the difference was statistically significant ($0.01 < p < 0.05$). There was no significant difference between T-cell percentages in rheumatoid and control peripheral blood.

In two RA patients receiving cyclophosphamide over an average period of 20 weeks, sequential studies of T-cells were performed on both the blood and synovial fluid. By the tenth week of treatment, they were markedly reduced in both synovial fluid and peripheral blood. By the 12th to the 15th week, however, at a time when the cumulative dose of cyclophosphamide was 5,000 mg, a rebound increase in T-cells was observed in the synovial effusion. The numbers of the T-cells in the blood concomitantly showed only a minimal rebound.