

3。

シェーグレン症候群の治療戦略のポイント

武井 正美 日本大学医学部内科学内科 I 部門外来医長
澤田 滋正 日本大学医学部内科学内科 I 部門教授,
日本大学医学部付属練馬光が丘病院内科部長

シェーグレン症候群の治療法は腺性、腺外性の症状に分けられ、これまで腺性症状には対症的な補充療法が主体となっていた。アセチルコリン作動薬である選択的ムスカリン受容体M₃刺激薬が開発され、臨床でも使用できるようになりその治療戦略の立てかたに大きな変化が起きている。とくにガム試験などの臨床検査データに変化があまり認められなくても患者の自覚症状の改善が認められることはquality of life (QOL) の改善につながる治療法となり得、福音は大きなものとなる。新たな治療戦略のポイントとして選択的ムスカリン受容体M₃刺激薬の解説を述べた。

Key word

シェーグレン症候群 治療 ムスカリン受容体

はじめに

シェーグレン症候群の内科的治療はムスカリン受容体M₃刺激薬がわが国で承認され一般臨床で使用できることとなり、これまで対症的に補充療法が主体となっていた治療戦略が強力な武器を手に入れ病氣と向かい合うことができるようになり、多角的に考えることが可能となってきた。

1 腺性シェーグレン症候群の治療

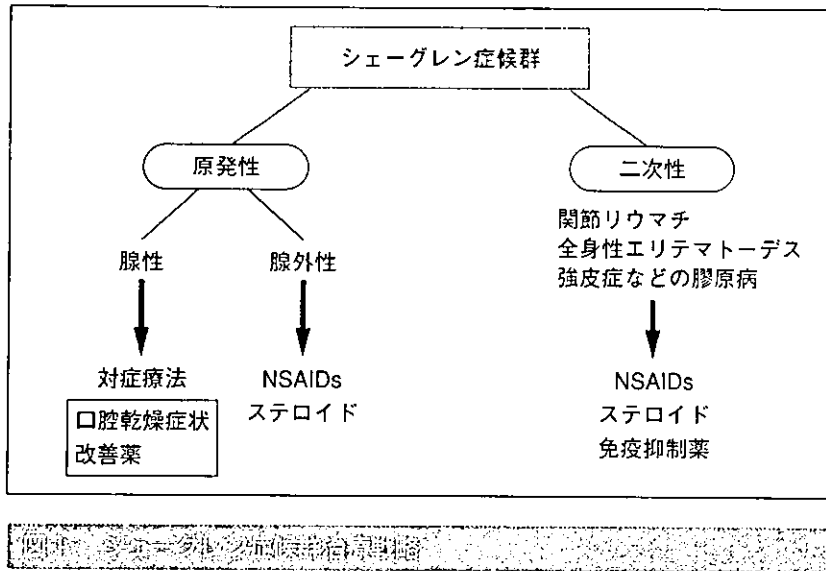
シェーグレン症候群の治療を選択するうえでの原則は、図1で示したようにその病態と合併している膠原病の状態によるものと考え、表1に腺性の症状をまとめる。このような症状のみの場合には、まず、対症的保存的に乾燥よりもたらされる種々の不快感を軽減することを目的として治療が試みられる。

1) 乾燥性角結膜炎の治療

乾燥眼では、人工涙液の使用、乾燥眼用眼鏡、外的要因(眼の酷使、エアコン、太陽、煙、副交感神経遮断薬、抗ヒスタミン薬など)の排除、涙点のコラーゲン、シリコンなどによる閉塞術が考えられ、重症の場合はビタミンA軟膏が有用との報告がある。また、シクロスポリンの点眼治療も試みられており、今後の検討が待たれる¹⁾。自己血清による点眼治療も試みられているが、医療機関での独自の調整が必要であり、感染の問題などもあり、まだ試験的である。

2) 口腔乾燥症状の治療

口腔乾燥症状は、人工唾液、シュガーレスガム、耳下腺マッサージ、去痰薬(プロムヘキシシなど)の大量投与が試みられているが、著明な効果は期待できない。漢方薬の効果も期待されており、ステロイドサポニンやイソフラボノイドを含む麦門冬に半夏、甘草、人参などを



含む麦門冬湯の投与が発症3年以内の初期に有効との報告もされている²⁾。

わが国では未承認であるが、副交感神経刺激薬でアセチルコリン作動薬のピロカルピン5mgの1日あたり3～4回の投与が有効であるが、投与後30分して著明な発汗を伴い、β遮断薬投与中の高血圧、狭心症の患者、その他の呼吸器、循環器疾患の患者、胃腸障害を有する患者には適用とされない。1966年ごろより報告がなされ、当初は放射線治療後の口腔乾燥症状に対する治療薬として使用されていたが、シェーグレン症候群に対する信頼できる臨床治験はなされていなかった³⁾。近年、米国ではシェーグレン症候群に対する治験がなされ⁴⁾、すでに承認されている。現在わが国では臨床治験が進行している。その他利胆薬として使用されていたアネトールトリチオンがシェーグレン症候群で承認され使われている。初期においては有効とされているが、重篤な肝障害においては、使用が禁忌となっており、重篤な副作用はないが、放屁の頻度が高く患者のコンプライアンスがあまりよくない。ヨードの全身投与は鼻咽腔分泌の促進を目的として使用される。

新たにシェーグレン症候群の治療薬として承認された塩酸セビメリン水和物（以下、セビメリン）は、キヌクリジン環を基本構造とするアセチルコリン作動薬で選択的ムスカリン受容体M₃刺激薬である。臨床試験で、本剤はプラセボと比較してシェーグレン患者の唾液分泌

腺性症状	対症的保存的治療
乾燥眼	人工涙液、ビタミンA軟膏、涙点閉塞術、外的要因の除去
口鼻腔乾燥	人工唾液、ガム、耳下腺マッサージ、去痰薬、鼻腔洗浄、口腔乾燥症状改善薬（セビメリン、アネトールトリチオン、塩酸ピロカルピン）、麦門冬湯、ヨード全身投与など
口腔乾燥	水溶性潤滑剤
皮膚乾燥	ワセリン、尿素製剤

量、自覚症状および他覚所見を有意に改善した。唾液腺細胞を直接刺激して唾液分泌を促す薬剤で、Saxonテストで0.5g/2分以下の唾液腺細胞の破壊が激しい患者や導管が閉塞し唾液腺の腫脹・疼痛のある患者では効果が出にくい。

シェーグレン症候群患者にセビメリン30mgを投与すると、投与後1～3時間後に唾液分泌量は最大となり、投与前値に対する最大唾液分泌量は平均2.37倍であった⁵⁾。シェーグレン症候群患者を対象とした臨床試験における、セビメリンの中等度以上の改善率は約50%であった。二重盲検比較試験において、プラセボと比較し、唾液増加率、口腔乾燥感、食物摂取困難、口腔内粘稠感などの自覚症状を改善し、口腔粘膜、舌、口唇、口角の乾燥症状などの他覚所見を有意に改善した⁵⁾。長期投与試験に

において、28週以上投与しても副作用の頻度の増加、重度の副作用の発現は認められず、有効性の減弱も認めなかった⁵⁾。開発時の統計では約30%に副作用を認め、嘔気10%、腹痛8%、下痢4%、多汗4%、嘔吐3%であった。動悸はまれな副作用としてあげられているが、市販後の投与経験では10~20%は一時的にも動悸を訴える患者がいる。おもな検査値の異常は血清アミラーゼ上昇4%、尿中NAG上昇3%、ALT (GPT) 上昇2%、AST (GOT) 上昇2%であった。

重篤な虚血性心疾患や不整脈、喘息などの肺疾患、てんかん、パーキンソン病、虹彩炎などの合併症のある患者への投与は注意を要する。乾燥性角結膜炎に対する効果も報告されており、30mg/日の投与で自觉症状Schirmer試験ともに12週間の二重盲験法で有意に改善を示した⁶⁾。

代表的な口腔乾燥症状に使用する内服薬について表2に示す。

3) その他の乾燥症状

鼻腔乾燥症状には生食水での鼻腔洗浄も有用である。鼻腔には生食水のスプレーで1日4~6回噴霧することも痂皮形成の予防になる。上気道、気管支、腔などの分泌が減少すると自浄作用が低下し、ときにカンジダなどの真菌が出現することがある。このような場合、抗真菌薬による加療が必要となる。また胃酸の分泌も低下するため、時として胃の不快感を訴え、慢性胃炎と診断され、H₂ブロッカーや制酸薬などが選択されることがあるが、これは無酸症にもとづく症状のことがあり、症状は改善しない。シェーグレン初期には唾液分泌の低下で胃酸の希釈がうまくいかず胃酸過多となり症状が出現する場合もあり、患者の状態を把握することが重要である。

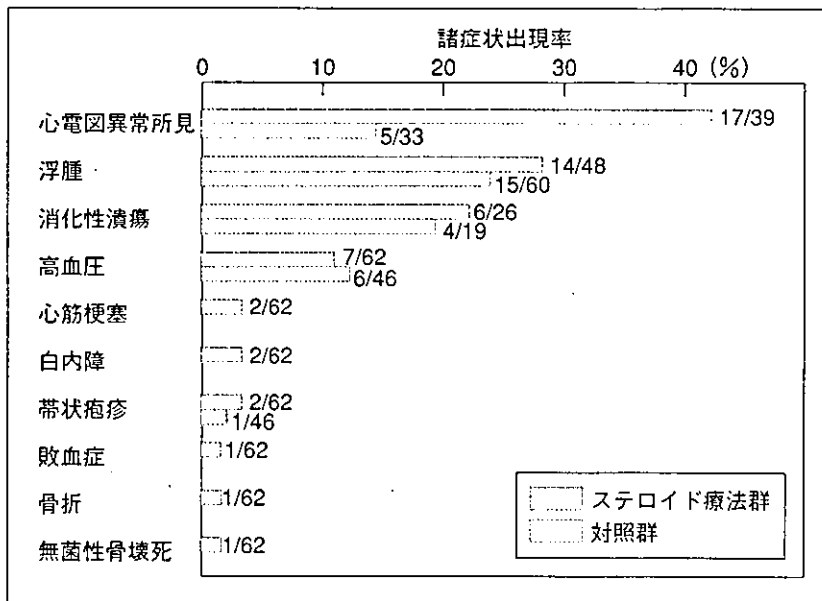
2 腺外症状、合併症の治療

持続する慢性の耳下腺腫脹には、短期間、中等量以下の副腎皮質ステロイドが効果がある。腺外性シェーグレ

製品名	エボザックカプセル 30mg	サリグレンカプセル 30mg	フェルビテン錠
一般名	塩酸セビメリン水和物		アネトールトリチオン
薬効分類名	口腔乾燥症状改善薬		肝・胆疾患利胆剤
効能・効果	シェーグレン症候群患者の口腔乾燥症状の改善		1. 下記疾患における利胆 胆道(胆管・胆のう)系疾患および胆汁うっ 帯を伴う疾患 2. シェーグレン症候群に伴う唾液分泌減少改善
用法・用量	通常、成人には塩酸セビメリンとして1回30mg(1カプセル)を1日3回、食後に経口投与する		アネトールトリチオンとして、通常成人1回25mgを1日3回経口投与する なお、年齢、症状により適宜増減する
薬効・薬理	唾液腺のムスカリン受容体を刺激し唾液分泌を促進する		唾液腺のホスホリパーゼC活性を亢進させ細胞内情報伝達系を活性化させる
臨床成績	シェーグレン症候群患者における改善率：52% (290例/558例) 対プラセボ有意差あり		シェーグレン症候群患者における改善率：29.2%
副作用	副作用発現率：30.9% (251/813) ・ 重大な副作用：間質性肺炎の増悪：0.2% ・ その他のおもな副作用：嘔気10.3%、腹痛7.7%、下痢4.4%、多汗3.9%、嘔吐3.1%		副作用発現率12.6% (169/1,341) ・ 重大な副作用なし ・ その他おもな副作用：鼓腸放屁5.7%、下痢1.9%
薬価収載年月	2001年8月		1967年7月
販売会社	第一製薬株式会社	日本化薬株式会社	日本新薬株式会社
資料	添付文書による	添付文書による	添付文書による

(次頁へつづく)

製品名	サリベート	KSS-694 (国内未承認)
一般名	—	塩酸ピロカルピン
薬効分類名	人工唾液	口腔乾燥症状改善薬
効能・効果	1. シェーグレン症候群による口腔乾燥症状の改善 2. 頭頸部の放射線照射による唾液腺障害にもとづく口腔乾燥症状の改善	1. シェーグレン症候群による口腔乾燥症状の改善 2. 頭頸部の放射線照射による唾液腺障害にもとづく口腔乾燥症状の改善
用法・用量	通常1回に1～2秒間口腔内に1日4～5回噴霧する。なお、症状により適宜増減する	治験にて1回2.5mgか5mgを1日3回経口投与する
薬効・薬理	人工唾液	副交感神経を刺激し分泌を促す
臨床成績	シェーグレン症候群における有効率：41.8%	シェーグレン症候群患者における改善率：29.2%
副作用	副作用発現率：3.3% ・重大な副作用なし ・その他おもな副作用：嘔気1.1%、味覚変化0.5%、腹部膨満感0.4%	USAでは15mgで発汗40%、嘔気9%、紅潮9%、鼻炎7%、頻尿10%、下痢6%、めまい6%など 65歳以上では頻尿、下痢、めまいが頻度多い
薬価収載年月	1985年12月	—
販売会社	帝人株式会社	—
資料	添付文書による	米国での添付文書による



(市川陽一ら、1979^{*)}より引用)

ン症候群の治療は副腎皮質ステロイド薬（ステロイド）の適用である。しかし、関節リウマチのステロイドの適用でもつねに問題となるように、長期投与による高率に出現する副作用と治療効果の利益とのバランスで選択されるため、きちんとした基準を述べることは、シェーグレン症候群の場合はとくに困難であり、しばしば、ステロイドの選択は実際の診療においても迷うことがある。一般的な副作用はよく知られているところであり、関節リウマチで1日20mgの長期投与時、プラセボと比較し疾患の活動性自体は改善されるが、死亡率、身体障害の進行度の増悪、長期副作用（骨粗鬆症など）の増加、入院加療の増加、直接的・間接的費用の増加があると報告されている⁷⁾。また少量5mg/日の投与もさまざまな副作用が起こりうるとの報告もある（図2）⁸⁾。シェーグレン症候群は、一般的には全身の臓器の障害が軽度で致命的になることがまれであり、急性の症状をステロイドで乗り越えれば中止できる病態でなく、慢性症状を長期に加療する必要があるため、ステロイドの適応はきわめて限られたものになる。腺外性シェーグレン症候群は、リンパ球の各臓器への浸潤によりさまざまな症状が出現する。これらの症状にはそれぞれの病態にあわせた治療が優先されるが、ステロイドを含む免疫抑制療法が必要となる場合もある。一般的な適応としてよく知られているものは、リンパ球浸潤により生じる急性で進行性の障害、発熱、多関節痛、反復性耳下腺腫脹、リンパ節腫脹による機能的・器質的障害、高 γ -グロブリン血症に伴う症状（紫斑など）などが考えられ、ステロイドの投与により症状、検査データは改善される。多くの乾燥症状の自覚の軽減や早期のシェーグレン症候群における外分泌腺の組織所見の改善にもとづく症状の改善が認められるが、ステロイドの減量により再燃するため乾燥症状をターゲットとしたステロイドの加療を目的とするといわずらに長期投与をすることとなる。また抗SS-A、抗SS-B抗体もステロイド加療に抵抗するため減量の目安とはならない。

シェーグレン症候群に合併する間質性肺炎は、ほかの膠原病に合併する間質性肺炎と比較して、ステロイド反応性のよいものとして知られている。シェーグレン症候群の肺病変は25～43%の合併があるといわれ、40～50歳

代の女性に多く、X線画像上は辺縁型は少なく全肺びまん性粒状、粒状輪状影で、組織所見ではリンパ球性間質性肺炎（lymphocytic interstitial pneumonitis）が多く、ステロイド治療に反応がよく、シェーグレン症候群のステロイドの適応としては効果が期待できるもののひとつである。

ステロイドのよい適応となるものに間質性腎炎が知られているが、シェーグレン症候群には糸球体腎炎も含め潜在性に合併する腎障害が約半数存在するとされ、尿濃縮力の障害、遠位尿管機能障害が検査上認められる。間質性の変化に伴って出現する尿細管アシドーシスは、約30%のシェーグレン症候群にみられ、遠位尿管性アシドーシスを合併することが多い。遠位型はH⁺の排泄障害でありアルカリ性薬（重曹など）の投与が奏効する。腎の生検にてリンパ球の浸潤が強く認められるときはステロイド治療が有効である。

神経障害としては、中枢性、末梢性に分けて考えることができる。なんらかの神経症状の合併はシェーグレン症候群の約40%合併するとされており、精神症状（うつや神経症など）は比較的軽度であり、向精神薬、抗不安薬でなんとかコントロールできるが、脳神経障害を合併するものにはステロイドの大量療法も試みられている。しかし、ステロイド投与は不要か、一時的な投与で簡単に離脱できるものが多く、無菌性髄膜炎の例でも自然治癒傾向が認められるとの報告もある。末梢性脳神経症状

病態	プレドニゾロン用量
LIP*	40～60mg
尿細管性アシドーシス	20～30mg
TSN**	40～60mg パルス療法 免疫抑制薬
自己免疫性慢性肝炎	20～30mg
血管性皮膚炎	5～10mg
発熱	5～10mg
筋関節痛	5～10mg (NSAIDs)
反復性耳下腺腫	20～30mg

* LIP : lymphocytic interstitial pneumonitis
**TSN : trigeminal sensory neuropathy

として三叉神経障害が有名であるが、知覚神経障害が合併することからtrigeminal sensory neuropathy (TSN)とよばれている。TSNは大量のステロイド、パルス療法、免疫抑制薬に抵抗性のものが多く、発症初期に十分量の十分な期間のステロイドの投与は有効の可能性があると考えられている。

皮膚症状として環状紅斑が有名だが、血管、付属器周囲のリンパ球浸潤が主体となり発症し、ステロイド少量投与により奏効し、色素沈着を残さない。高 γ -グロブリン血症に伴う紫斑も有名であるが、ときにはステロイドが必要となる。オーラノフィンの投与が有効との報告もある。

関節炎や筋炎は重症のものが少なく非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) でほとんどがコントロールできるが、ときに少量短期のステロイド治療が必要な場合もある。

表3に私案として腺外性シェーグレン症候群のステロイドの治療の目安をまとめてみた。当然のことながら、プレドニゾロンの用量はその患者の病気の重症度により変化するものとする。ステロイドが効果なく、またはその副作用のため使用できない場合、代謝抑制薬のアザチオプリンやアルキル化薬のシクロホスファミドが重症の病態に1.0~3.0mg/kg/日で経口で使用されたり、初期量0.75g/mm²で3~4ヵ月ごとに半年から1年のあいだシクロホスファミドの静注によるパルス療法が選択される。投与後10日目に白血球数3,000/mm³くらいの状態となるよう量を調節する必要がある。シクロスポリンの少量投与は現在のところ腎毒性、悪性リンパ腫の発症を増加させることからシェーグレン症候群には不適とされている。血漿交換も高度のクリオグロブリン血症、高 γ -グロブリン血症に伴う全身性合併症が出現したときには有用な手段となるものと考えられる。

おわりに

近年、免疫抑制薬、TNF- α 阻害薬などの生物学的製剤などの適用が検討されはじめ、新しい治療戦略として取り入れられる可能性がある。忘れてはならないことは、どうしても敵に対する武器はより強力なものを使用したくなることがつねであり、深追いで、かえって重篤な

副作用を引き起こし、病気は制御できたかにみえるが生命予後に大きな影響を残してしまう結果となる可能性があることを、つねに治療戦略を立てるうえで考えに入れなければならない。シェーグレン症候群は一般的には生命予後のよい良性疾患であることをあらためて思い起こすことも必要である。

文 献

- 1) Sali K, Stevenson OD, Mundorf TK *et al*: Two multicenter, randomized studies of the efficacy and safety of cyclosporine ophthalmic emulsion in moderate to severe dry eye disease. CsA Phase 3 Study Group. *Ophthalmology* 107: 631-639, 2000
- 2) 後藤真: 今月の治療. リウマチ・膠原病—膠原病の漢方治療. *Curr Ther* 19: 132-136, 1990
- 3) Nusair S, Rubinow A: The use of oral pilocarpine in xerostomia and Sjogren's syndrome. *Semin Arthritis Rheum* 28: 360-367, 1999
- 4) Vivino FB, Al-Hashimi I, Khan Z *et al*: Pilocarpine tablets for the treatment of dry mouth and dry eye symptoms in patients with Sjogren syndrome: a randomized, placebo-controlled, fixed-dose, multicenter trial. P92-01 Study Group. *Arch Intern Med* 159: 174-181, 1999
- 5) エボザックカプセル30mg医薬品インタビューフォーム, 第一製薬, 1998年9月
- 6) Petrone D, Condemi JJ, Fife R *et al*: A double-blind, randomized, placebo-controlled study of cevimeline in Sjogren's syndrome patients with xerostomia and keratoconjunctivitis sicca. *Arthritis Rheum* 46: 748-754, 2002
- 7) Fries JF: Toward an understanding of patient outcome measurement. *Arthritis Rheum* 26: 697-704, 1983
- 8) 市川陽一, 齊藤栄造, 阿部好文ほか: 膠原病ステロイド療法の適応と限界. *ホルモンと臨床* 27: 1111-1116, 1979

筆頭著者

Profile

武井 正美 (TAKEI masami)

1980年 日本大学医学部卒業

1985~88年 米国テキサス大学 Prof. N.

Talalのもとでシェーグレン症候群の研究

専門: 内科学, リウマチ膠原病学

趣味: つり

cDNAマイクロアレイによりシェーグレン症候群の疾患関連遺伝子を検討している。

カラーで見る

新・膠原病

診断と治療

——皮膚から内臓へ——



〈ヘリオトロープの花〉

編集

金沢大学医学部皮膚科教授

竹原和彦

慶應義塾大学医学部先端医科学研究所講師

桑名正隆

京都大学医学部皮膚科教授

宮地良樹



診断と治療社

第3節 全身性エリテマトーデスの活動性評価と治療

Essential Points

- ▶ SLEの治療方針の決定にあたっては、重症度からみた病型分類が実用的である。
- ▶ 副腎皮質ステロイドなどは、一般的に重症例ではプレドニゾン 60 mg/day, 中等症～軽症の例では 30～50 mg/day より開始する。
- ▶ 重症例や難治例に対しては、副腎皮質ステロイドのパルス療法や免疫抑制薬の併用を考慮する。

Key Words

- ① SLE disease activity index (SLEDAI)
- ② ループス腎炎 (lupus nephritis)
- ③ 抗リン脂質抗体症候群 (anti-phospholipid syndrome)

a 全身性エリテマトーデス (SLE) の活動性の評価

1) 一般的な活動性の評価

1992年に提唱された SLE disease activity index (SLEDAI) は、SLE でみられる主要な症状・検査異常を重症度に応じてスコア化したものであり、その加算値によって活動性を判定するものである(表1)¹⁾。SLEDAIでは計23項目の基準項目(臨床症状および検査所見)が統計学的解析により抽出され、その重要度に応じて四つのカテゴリーに分け、8点8項目、4点6項目、2点6項目、1点3項目とスコア化されているのが特徴である。さらに本基準では来院時あるいは10日以内に認められた所見を評価する時間的要素も加味されている点に特徴があるとされている。通常、活動性のある未治療では10～15以上の数値を示すとされている。このSLEDAIは現在も国際的に用いられているが、中枢神経病変の重みが強調されすぎている観がある。

一方、わが国においては、昭和60年に厚

生省自己免疫調査研究班により SLE 活動性判定基準が提唱されている(表2)²⁾。これによるとその感度は95.7%で、特異性は94.0%である²⁾。こうした活動性の評価の基準は、臨床研究などの際には用いられるが、治療方針の決定に用いるには実用的であるとはいいがた

表2 SLE 活動性判定基準(9項目)

1. 発熱
2. 関節痛
3. 紅斑(顔面以外も含む)
4. 口腔潰瘍または大量脱毛
5. 赤沈亢進(30 mm/hr 以上)
6. 低補体血症(CH50:20 U/ml 以下)
7. 白血球減少症(4000/mm³ 以下)
8. 低アルブミン血症(3.5 g/dl 以下)
9. LE細胞またはLEテスト陽性

(厚生省特定疾患自己免疫調査研究班, 昭和60年)

表3 SLEの重症度から見た病型分類

1. 軽症
 ディスコイド疹
 皮疹, 粘膜症状
 関節炎, 筋肉痛
 Raynaud 現象
 漿膜炎(少量の貯留液)
 尿沈渣異常/間欠的蛋白尿
2. 中等症
 持続性蛋白尿
 溶血性貧血
 血小板減少性紫斑病
 中枢神経症状(脳神経障害, 髄膜炎, 機能的
 精神症状など)
 漿膜炎(多量の貯留液)
3. 重症
 ネフローゼ症候群
 腎不全(急速進行性, 慢性)
 中枢神経症状(けいれん重積, 意識障害, 器
 質的精神病)
 間質性肺炎, 肺出血
 肺高血圧症
 全身性血管炎・血栓症

(厚生省特定疾患自己免疫調査研究班, 1991)

表 I SLEDAI

基準項目	定義
痙攣(8)	最近の発症。代謝異常・感染・薬物が原因のものは除外する
精神症状(8)	認知機能の重度の障害に基づく正常活動能力の変化 幻覚、錯乱、著明な連合能力の障害、思考内容の貧困化、著明な非論理的行動、奇妙な分裂病的あるいは緊張的な行動を含む。尿毒症や薬物が原因のものは除外する
脳器質症候群(8)	見当識・記憶その他の知的機能の障害を伴う精神機能の変調(急性に発症し、症状の変動を伴う)。集中力低下を伴う意識混濁、および周囲に対する注意力維持の不能と(認知障害、会話錯乱、不眠または日中傾眠、または精神運動活動の亢進または低下)のなかの2項目以上を伴う場合を含める。代謝異常、薬物が原因のものは除外する
視力障害(8)	SLEの網膜病変(綿花様白斑、網膜出血、脈絡膜の滲出または出血、視神経炎を含む)。高血圧、感染または薬物が原因の場合は除外する
脳神経障害(8)	新しく起こった脳神経領域の知覚または運動神経障害
ルーブス頭痛(8)	重度の持続性頭痛。片頭痛のこともあるが、麻薬性鎮痛薬に反応しない
脳血管障害(8)	新しく起こった脳血管障害。動脈硬化症は除外する
血管炎(8)	潰瘍、壊疽、有痛性手指結節、爪周囲梗塞、爪下出血斑、または生検あるいは動脈造影による血管炎の証明
関節炎(4)	疼痛と炎症性徴候(圧痛、腫脹または関節液貯留)を伴う二つ以上の関節罹患
筋炎(4)	CK/アルドラーゼの上昇または、筋炎を示す筋電図変化または生検所見を伴う近位筋の筋痛と筋力低下
円柱尿(4)	尿ヘム-顆粒円柱または赤血球円柱
血尿(4)	赤血球5個以上/毎高倍率視野。結石、感染または他の原因によるものを除く
蛋白尿(4)	新たに出現した0.5 g/24hr以上の蛋白尿または最近の0.5 g/24hr以上の尿蛋白の増加
膿尿(4)	白血球5個以上/毎高倍率視野。感染を除く
新たな皮疹(2)	炎症性皮疹の新たな出現または再発
脱毛(2)	病的な斑状またはびまん性の脱毛の新たな出現または再発
粘膜潰瘍(2)	口腔粘膜または鼻粘膜潰瘍の新たな出現または再発
胸膜炎(2)	胸膜摩擦音または胸水貯留を伴う胸膜炎による胸痛または胸膜の肥厚。心膜摩擦音、心嚢液貯留、または心電図、心エコー図の少なくとも一つにより確認された心膜痛
低補体血症(2)	CH50、C3、またはC4の正常下限以下への減少
抗DNA抗体上昇(2)	Farrアッセイで結合率25%以上、または他の検査での正常範囲以上への増加
発熱(1)	38℃以上。感染によるものを除外する
血小板減少(1)	血小板数10万/mm ³ 未満
白血球減少(1)	白血球3,000/mm ³ 未満

(文献1より改変)

カラーで見る

新・膠原病

診断と治療

— 皮膚から内臓へ —



〈ヘリオトロップの花〉

編集

金沢大学医学部皮膚科教授

竹原和彦

慶應義塾大学医学部先端医科学研究所講師

桑名正隆

京都大学医学部皮膚科教授

宮地良樹



診断と治療社

第17節 妊娠・出産時における膠原病の治療

Essential Points

- ▶ RA に対しては、妊娠が明らかになった時点で NSAIDs と DMARDs はすべて中止し、プレドニゾロンのみ (10 mg/day 程度) の投与を行う。
- ▶ 抗リン脂質抗体陽性の患者に対しては、流早産を予防するために低用量アスピリンの投与を行う。
- ▶ 分娩後は、出産に伴う内分泌環境の急速な変化に伴い、SLE の活動性は増悪する場合が多い。

Key Words

- ① メトトレキサート (methotrexate)
- ② 抗リン脂質抗体 (anti-phospholipid antibody)
- ③ 新生児ループス (neonatal lupus erythematosus)

a 関節リウマチ (RA)

1) RA が妊娠に及ぼす影響

RA そのものが妊娠に及ぼす影響は、血管炎などの特殊な場合を除いてほとんどみられない。むしろ RA に対して用いられている治療薬が問題になることが多い。非ステロイド抗炎症薬 (NSAIDs) はプロスタグランジンの産生を阻害することから、妊娠期間や分娩時間を延長する可能性が指摘されているが、催奇性を支持するエビデンスは今のところ報告されていない。一方、抗リウマチ薬 (DMARDs) には、催奇性の危険のあるものが多く注意が必要である。特に、メトトレキサートと経口金製剤 (オーラノフィン) については催奇性が証明されている。副腎皮質ステロイドはプレドニゾロンであれば胎盤で分解されるため胎児への影響はほとんどない。

2) 妊娠が RA に及ぼす影響

一般に妊娠中は RA の活動性は低下する。この一つの機序として、妊娠後期に産生される抗 HLA-DR 抗体が関与する可能性が指摘されている。また妊娠中は血中コルチゾールが

上昇することも、RA の活動性低下の一因と考えられている。

3) 妊娠中の RA の治療

妊娠中は RA の活動性が低下すること、さらに NSAIDs や DMARDs の母体・胎児への影響を考えて、妊娠が明らかになった時点で NSAIDs と DMARDs はすべて中止し、プレドニゾロンのみ (10 mg/day 程度) の投与を行う。メトトレキサートやオーラノフィンは拳児希望の (メトトレキサートは男性も) 患者には投与を控える。

4) 出産後の病状の変化と治療

妊娠中は抑えられていた RA の活動性は、分娩後数か月以内には必ずといってよいほど増悪する。したがって、分娩後はなるべく早い時期に DMARDs を再開するのがよい。NSAIDs も適宜再開し、妊娠前の治療に戻していく。ただし、これらの薬剤の乳汁中への移行と新生児に対する安全性については確立しておらず、原則として母乳ではなく人工乳による哺乳とする。

b 全身性エリテマトーデス (SLE)

1) SLE が妊娠に及ぼす影響

SLE の活動性が高く、高用量の副腎皮質ステロイドや免疫抑制薬の投与を受けている間は、無月経となることも多く、まず妊娠することはない。SLE の活動性がある程度コントロールされた患者が妊娠した場合に問題となるのは、抗リン脂質抗体症候群を合併した場合の流早産と新生児ループスの問題である。SLE 患者のほとんどに副腎皮質ステロイドが投与されているが、通常用いられるプレドニゾロンは胎盤の 11β -dehydrogenase によって不活化されることから、胎児にはほとんど影響はない。

a) 抗リン脂質抗体が妊娠に及ぼす影響

抗カルジオリピン抗体、抗カルジオリピン/ β_2 グリコプロテイン I 複合体抗体・ループス抗凝固血素などの抗リン脂質抗体が陽性の患

者では、血栓症・習慣性流産が多くみられることが知られている。検査では、血小板減少、aPTTの延長がみられることが多い。抗リン脂質抗体陽性のSLE患者では、胎盤の血管の閉塞などにより胎盤機能の低下をきたし、流産をきたしやすい。また、子宮内発育遅延や低体重出生児の頻度も高くなる。

b) 新生児ループス

新生児は免疫グロブリン産生能がないが、まれに母体由来の免疫グロブリンのために、SLE様症状が出現することがあり、新生児ループスとよばれる。新生児ループスの症状としては、紅斑、血液異常(溶血性貧血、白血球減少、血小板減少)などが多くみられるが、これらは一過性で、通常1年以内に消失し再発はみられない。一方、恒久的な障害として、心ブロック(完全房室ブロック)をきたすことがよく知られている。この先天性心ブロックをきたす新生児の母親のほぼ全例で抗SS-A抗体あるいは抗SS-B抗体が陽性であることから、これらの抗体がその発症に深く関与することが考えられている。

2) 妊娠がSLEに及ぼす影響

以前からSLE患者が妊娠するとSLEが増悪するといわれてきた。確かに頻度は少ないものの、活動性のSLE患者(特に腎症を有する症例)が妊娠するとSLEは増悪することが多い。しかし、妊娠中毒症の合併や、妊娠によりステロイドを減量したための増悪などの可能性もあり、これらを除くと妊娠がSLEを増悪させるという確かなエビデンスはない。むしろ、妊娠中は内因性のコルチゾールの分泌の上昇により、SLEは安定した経過をとることが多い。ただ、分娩後は増悪する危険性が高いので、特別な配慮が必要となる。

3) 妊娠を許可する条件

SLEが妊娠により増悪するという確かなエビデンスがないが、妊娠中毒症などの合併を考えた場合、妊娠を許可するか否かについては、プレドニゾロンの投与量や腎機能に基づ

いた一定の条件を付すこともやむをえないと考えられる。しかし、この条件に合わない患者が妊娠した場合でも、人工中絶によりさらにSLEが増悪することもあるので、安易に行うべきではない。

4) 妊娠中のSLE治療

一般的には安定している患者では妊娠中もSLEが増悪することは少ない。もし増悪傾向を認めた場合には、副腎皮質ステロイド(プレドニゾロン)の増量を行い、安易な人工中絶は慎むべきである。抗リン脂質抗体陽性の患者に対しては、流産を予防するために低用量アスピリンの投与を行う。アスピリンに代わりヘパリンの投与を行うこともある。

5) 出産後の病状の変化と治療

a) 病状の変化

出産に伴う内分泌環境の急速な変化に伴い、SLEの活動性は増悪する場合が多い。これは、妊娠中に活動性がよくコントロールされていても起こることがあるので、十分な注意が必要である。

b) 治療方針

分娩時より副腎皮質ステロイドを20～50%程度増量する。分娩2～3週間後より検査データをみながら徐々に減量する。新生児ループス(先天性ブロック)については、特に抗SS-A抗体や抗SS-B抗体の患者の出産の場合には前もってその存在を見落とさぬよう留意し、出産後に障害が発見されたら迅速な対応を行う。

c) その他の膠原病

Behçet病、皮膚筋炎/多発性筋炎などでも妊娠中や分娩後の増悪がありうる。主として副腎皮質ステロイドの増量により対応する。強皮症では妊娠により腎機能の悪化をみることもあるので注意が必要である。

▶ 文献

- 1) 隅谷護人：全身性エリテマトーデス：診断と治療の進歩 II. 治療 5. 特殊な病態の臨床と治療 6) SLEと妊娠. 日本内科学会雑誌 79:1412-1415, 1990

ESSENCE

膠原病・リウマチ

— 診断へのアプローチ —

編集

住田孝之

筑波大学臨床医学系内科教授



診断と治療社

Behçet 病

表 32-1 Behçet 病診断基準

主 症 状	口腔粘膜の再発性アフタ性潰瘍
(1) 皮膚症状	a) 結節性紅斑
(2) a) 皮下の血管性静脈炎	b) 毛嚢炎様皮疹, 痤瘡様皮疹
(3) 眼症状	a) 虹彩毛様体炎 (網脈絡膜炎)
a) 虹彩毛様体炎 (網脈絡膜炎)	b) 網脈絡膜萎縮, 視神経萎縮, 併発白内障, 結核球内障, 眼球萎縮
(4) 副症状	変形や強直を伴わない関節炎
(1) 副腎丸炎	(2) 回盲部潰瘍で代表される消化器病変
(3) 血管病変	(4) 中等度以上の中枢神経病変
(5) 中等度以上の中枢神経病変	
病型診断の基準	
(1) 完全型	主症状四つ
(2) 不完全型	主症状三つ (あるいは主症状二つと副症状二つ)
(3) 疑い	眼症状 + 主症状一つ (あるいは副症状二つ)
(4) 特殊型	主症状の一部が出没
a) 腸管(型) Behçet 病	
b) 血管(型) Behçet 病	
c) 神経(型) Behçet 病	
d) 神経所見	
参考となる検査所見	
(1) 皮膚の針反応	
(2) 赤沈促進, 血清 CRP の陽性化, 末梢白血球数の増加	
(3) HLA-B51 (BS) の陽性	

(水島 裕, ほか: 最新医学 43: 382-391, 1988)

表 32-2 Behçet 病の国際診断基準 (1990 年)

再発性口腔内潰瘍形成: 医師の観察または信頼できる患者の報告による小アフタ性, 大アフタ性またはヘルペス状の潰瘍形成が 12 か月間に少なくとも 3 度出たこと

再発性口腔内潰瘍形成が 2 つあり, さらに次の 4 項目のうち 2 項目が存在すること

再発性外陰部潰瘍形成: 医師の観察または信頼できる患者の報告によるアフタ性潰瘍形成, または瘻管形成

眼病変: 前眼部ぶどう膜炎, 後眼部ぶどう膜炎, または虹彩毛様体炎, 網脈絡膜炎, 網脈絡膜萎縮, 視神経萎縮, 併発白内障, 結核球内障, または熟練した医師(眼科医)の観察による網膜血管炎

皮膚病変: 医師の観察または信頼できる患者の報告による結節性紅斑, または結核球内障, 結核球内障, または熟練した医師(皮膚科医)の観察による結核球内障

パテलगリーマーテスト: 医師の観察または信頼できる患者の報告によるパテलगリーマーテスト 24 時間後に医師により観察されたもの

注: これらの項目は他疾患を除外できたときにのみ適用できる

(International Study Group for Behçet's Disease: Lancet 335: 1078-1080, 1990)

[診断の ESSENCE]

- 表 32-1 の診断基準を満たせば診断(不完全型が完全型)。
- 特殊病型であっても, 不完全型が完全型の基準を満たす必要がある。
- 表 32-2 の国際診断基準を満たしても診断できるが, 厚生労働省の難病認定のためには表 32-1 の基準を満たす必要がある。
- 再発性口腔内アフタ性潰瘍, 皮膚症状, 外陰部潰瘍, 眼病変を四大主症状とする。
- 一定の部位の炎症が慢性に持続するのではなく, 急性の炎症が特反復し, 増悪と寛解を繰り返しつつ遷延した経過をとるのが特徴である。急性期には時に発熱を伴う。
- 男女比は 0.98 であり, 発病年齢は 30 歳代にピークがある。
- 特殊病型として, 腸管の潰瘍性病変を示す腸管 Behçet, 大小の動脈脈管病変をきたす血管 Behçet, 脳幹・小脳・大脳白質の病変を主体とする神経 Behçet の三型がある。
- 関節炎は四肢の大小関節に非対称の発赤・腫脹とともに出現し, 約 1~2 週で消失し, 関節の弧形・強直や骨破壊をきたすことはまれである。
- 表 32-1 の診断基準にある主症状を念頭に, Behçet 病であることを思い浮かべることが重要。
- HLA-B51 との相関が認められ, その陽性率は約 53.8% (完全型 58.3%, 不完全型 51.3%) である。
- 本症では皮膚の被刺激性が亢進しており, 虫刺され・外傷などにより容易に化膿する傾向がある。
- 活動期には末梢白血球数の増加, 赤沈の促進, 血清 CRP 陽性, 血清補体価の上昇等がみられるが, 抗核抗体などの自己抗体は通常陰性である。
- Behçet 病に最も特異性の高い検査は, 皮膚の被刺激性の亢進を反映する針反応(パテलगリーマーテスト(pathergy test))である。無菌の注射針を前腕部の皮膚に刺入し, 24~48 時間後に同部の発赤・腫瘍の形成を認めれば陽性である。針反応陽性なら, 表 32-2 の国際診断基準の 1 項目を満たすことになる。
- 慢性進行型の神経 Behçet 病では髄液中の IL-6 が持続的に異常高値(通常 20 pg/ml 以上)を示すので, 進行性の精神症状を認める場合は必ず検査を行う。

[鑑別診断]

- 主症状とまぎらわしいもの
Reiter 病, 慢性再発性アフタ症, Lipschutz 病, 単純ヘルペス, Sweet 病, サルコイドーシス, 中心性網膜炎
- 副症状とまぎらわしいもの
関節炎: 痛風
消化器病変: Crohn 病, 潰瘍性大腸炎
血管症状: 高安病, Buerger 病
神経症状: 多発性硬化症, 脳血管障害, 中枢神経感染症, 精神病

Research article

VLA-4-dependent and -independent pathways in cell contact-induced proinflammatory cytokine production by synovial nurse-like cells from rheumatoid arthritis patients

Eiji Takeuchi^{1,2,4}, Toshiyuki Tanaka¹, Eiji Umemoto¹, Tetsuya Tomita², Kenrin Shi², Koichiro Takahi², Ryuji Suzuki³, Takahiro Ochi² and Masayuki Miyasaka¹

¹Laboratory of Molecular and Cellular Recognition, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan

²Department of Orthopaedic Surgery, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan

³Research Unit of Immunology, Shionogi Institute for Medical Science, Shionogi & Co. Ltd, Osaka, Japan; current address: Pharmacology Research Laboratories, Pharmaceutical Research Division, Takeda Chemical Industries Ltd, Osaka, Japan

⁴Current address: Department of Orthopaedic Surgery, Osaka Rousai Hospital, Osaka, Japan

Correspondence: Masayuki Miyasaka (e-mail: mmiyasak@orgctl.med.osaka-u.ac.jp)

Received: 26 June 2002 Revisions received: 4 July 2002 Accepted: 15 July 2002 Published: 12 August 2002

Arthritis Res 2002, **4**:R10 (DOI 10.1186/ar593)

© 2002 Takeuchi *et al.*, licensee BioMed Central Ltd (Print ISSN 1465-9905; Online ISSN 1465-9913)

Abstract

Nurse-like stromal cell lines from the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis (RA-SNC) produce, on coculture with lymphocytes, large amounts of proinflammatory cytokines. In the present paper, we analyze the molecular events necessary for the induction of cytokine release from RA-SNC cells, and particularly the roles played by cell adhesion and the transmigration (also known as pseudoemperipolesis) of lymphocytes. For this purpose, the effects of various mAbs on the binding and transmigration of a human B-cell line, MC/car, were examined using a cloned RA-SNC line, RA-SNC77. To analyze the role of lymphocyte binding and transmigration on upregulated cytokine production by the RA-SNC77 cells, we used C3 exoenzyme-treated MC/car cells, which could bind to RA-SNC77 cells but could not transmigrate. Treatment with anti-CD29 or anti-CD49d mAb significantly reduced binding and transmigration of the MC/car cells. In contrast, the neutralizing anti-

CD106/vascular cell adhesion molecule 1 mAb did not show any inhibitory effect. Likewise, none of the neutralizing mAbs against CD11a, CD18, CD44, CD49e, or CD54 showed significant effects. Binding of C3-treated or untreated MC/car cells to RA-SNC77 cells induced comparable levels of IL-6 and IL-8 production. In addition, the enhanced cytokine production by RA-SNC77 cells required direct lymphocyte contact via a very late antigen-4 (VLA-4)-independent adhesion pathway. These results indicate that, although both the VLA-4-dependent/vascular cell adhesion molecule 1-independent and the VLA4-independent adhesion pathways are involved in MC/car binding and subsequent transmigration, only the VLA4-independent adhesion pathway is necessary and sufficient for the enhanced proinflammatory cytokine production by RA-SNC77 cells. The transmigration process, which is dependent on Rho-GTPase, is not a prerequisite for this phenomenon.

Keywords: cell adhesion, cytokine production, nurse cells, rheumatoid arthritis, transmigration

Introduction

Nurse cells were first recognized in the thymus, where they form a unique cellular complex with thymocytes [1,2] and have been implicated in the positive and negative selection of the developing thymocytes [3–6]. We previously established nurse-like stromal cell lines from the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis

(RA-SNC) [7]. These stromal cell lines are large adherent cells with multiple long cytoplasmic projections, and are morphologically distinct from typical fibroblasts or macrophage-like cells. When cocultured with lymphocytes, the stromal cell lines avidly bind the lymphocytes and readily allow them to transmigrate beneath the RA-SNC cells. This cellular interaction, pseudo-

bp = base pairs; BSA = bovine serum albumin; CS-1 = connecting segment-1; DMEM = Dulbecco's modified Eagle's medium; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; FCS = fetal calf serum; FITC = fluorescein isothiocyanate; IL = interleukin; mAb = monoclonal antibody; PBS = phosphate-buffered saline; PCR = polymerase chain reaction; RA = rheumatoid arthritis; RA-SNC = nurse-like stromal cell lines from the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis; VCAM-1 = vascular cell adhesion molecule 1; VLA-4 = very late antigen-4.

emperipolesis, is a characteristic feature of nurse cell interactions with lymphocytes.

The RA-SNC are capable of supporting cell proliferation and immunoglobulin secretion of B cells *in vitro* [7], and they spontaneously produce a variety of proinflammatory cytokines [7]. On direct cell-to-cell contact with lymphocytes, RA-SNC secrete a large amount of proinflammatory cytokines, including IL-6 and IL-8 [7]. Because the stromal cells with the apparent nurse-cell-like activity can be generated from long-term cultures of synovial tissues or bone marrow of rheumatoid arthritis (RA) patients, but not from non-RA controls, we speculated that the nurse-like cells might contribute to the dysregulated immune responses observed in RA patients by interacting with infiltrating lymphocytes in the microenvironment of the RA synovial tissue or bone marrow [7–9]. The cellular and molecular events leading to the enhanced proinflammatory cytokine production by the RA-SNC have not, however, been fully characterized.

In the present study, we attempt to characterize the molecular events required for enhanced cytokine production by RA-SNC, and examine the adhesion pathways involved in the interaction between lymphocytes and a cloned nurse-like cell line, RA-SNC77, generated from the long-term culture of RA synovial tissues. We also examine the relative contribution of lymphocyte binding and subsequent transmigration to the accelerated proinflammatory cytokine production by the RA-SNC77 cells, and show that lymphocyte binding mediated by the very late antigen-4 (VLA-4)-independent pathway is sufficient to induce the accelerated proinflammatory cytokine production.

Materials and methods

Cell culture

RA-SNC clones were obtained as previously described [7]. Briefly, RA synovial tissue was cut into pieces and digested with 0.1% collagenase Type IV (Sigma, St Louis, MO, USA), 0.1% hyaluronidase (Sigma), and 0.01% DNase (Sigma). The resultant single-cell suspension was plated onto culture dishes and maintained in DMEM (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) containing 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, 50 μ M 2-mercaptoethanol, 10 mM NaHCO₃, 2 mM L-glutamine, 1% (v/v) 100 \times nonessential amino acids (ICN, Costa Mesa, CA, USA), 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, and 10% heat-inactivated FCS (Hyclone Laboratories, Logan, UT, USA). After four to five passages, leukocytes and macrophages were removed from the culture and only the adherent, and apparently homogeneous, stromal cells remained. These were then cloned by the limiting dilution method and examined for the ability to mediate pseudoemperipolesis. One of the RA synovial nurse cell clones, RA-SNC77, which showed a strong pseudoemperipolesis ability, was used in this study.

Human B-cell lines (MC/car and Nalm-6) and a T-cell line (Jurkat) were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). A human T-cell line (Molt-17) was a kind gift from Dr J Minowada (Fujisaki Cell Center, Okayama, Japan). The B-cell and T-cell lines were maintained in RPMI 1640 medium (Gibco BRL) containing the same supplements as already described for the RA-SNC77 line.

Reagents

Mouse mAbs against human adhesion molecules (CD11a-5E6, anti-human CD11a/LFA-1 α ; AZN-L27, anti-human CD18/integrin β 2; Lia1/2, anti-human CD29/integrin β 1; 5F12, anti-human CD44; ACT-1, anti-human integrin α 4 β 7) were obtained through the V1th Human Leukocyte Differentiation Antigen Workshop (Kobe, Japan, 1996). HP2.1 (anti-human CD49d/VLA4 α), RR1/1 (anti-human CD54/intercellular adhesion molecule 1), and 1.G11B1 (anti-human CD106/vascular cell adhesion molecule 1 [VCAM-1]) were obtained from Coulter (Hialeah, FL, USA). KH33 (anti-human CD49e/VLA5 α) was from Seikagaku-Kogyo (Tokyo, Japan). C3 transferase, an inhibitor for the small GTPase Rho, was kindly provided by Dr S Narumiya (Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan).

Surface antigen analysis

Cells were incubated with each mAb for 30 min at 4°C, and washed twice with PBS containing 0.1% BSA. The cells were then incubated with FITC-conjugated goat anti-mouse IgG for 30 min at 4°C, and washed twice. The stained cells were analyzed on an EPICS-XL flow cytometer (Coulter).

Reverse transcription-polymerase chain reaction

Total RNA was isolated using TRIZOL (Gibco BRL) according to the manufacturer's instructions. First-strand cDNA synthesis from total RNA (1 μ g) was performed using Ready-To-Go™ (Amersham, Uppsala, Sweden) with an oligo(dT) primer. PCR was carried out using primer pairs specific to the connecting segment-1 (CS-1) isoform of fibronectin (5'-CATCATCAAGTATGAGAAGCC-3' and 5'-GCTGAATACCATTTCAGTG-3') [10], to SDF-1 α (5'-TGGATTCAGGAGTACCTGGA-3' and 5'-CGTATGCTATAAATGCAGGG-3') [11] or to CXCR4 (5'-TTC-TACCCAATGACTTGTG-3' and 5'-ATGTAGTAAGGCAGCCAACA-3') [11] with ExTaq polymerase (TaKaRa, Otsu, Japan) under the following conditions for 27 cycles: 94°C for 30 s, 57°C for 30 s, and 72°C for 30 s. As a control, a primer pair for β -actin (5'-CAAGATGATGGCCACGGCTGCT-3' and 5'-TCCTTCTGCATCTGTCCGCA-3') was used. PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis.

Treatment with mAb

Lymphoma cells were pre-incubated with DMEM containing 20 μ g/ml mAb for 30 min at 4°C before the adhesion

assay was performed. Cultured RA-SNC77 cells were similarly pre-incubated with mAb for 30 min at 37°C before coculture. The antibody-treated cells were then used without washing for the adhesion and transmigration assay, as described later.

Treatment with Rho inhibitor C3

MC/car cells were pre-incubated with DMEM containing various concentrations of C3 transferase for 48 hours. Cells were washed three times with RPMI 1640 without FCS to remove free C3 transferase and were plated onto a monolayer of RA-SNC77 cells.

Adhesion assay

Adhesion between the RA-SNC77 and lymphocyte cell lines was evaluated as previously described [12]. RA-SNC77 cells were plated into 96-well flat-bottomed culture plates at 1×10^4 cells/well and cultured for 2 days before use. Lymphocytes (4×10^6 cells/ml) were labeled with $5 \mu\text{M}$ 2',7'-biscarboxyethyl carboxyfluorescein tetraacetoxymethyl ester (Dojindo, Kumamoto, Japan) in RPMI for 1 hour at 37°C, were washed with RPMI containing 10% FCS, were resuspended in DMEM containing 10% FCS, and were plated (2×10^5 cells/well) onto a monolayer of RA-SNC77 cells with or without mAb (in triplicate). After 30 min of incubation, the wells were entirely filled with DMEM and sealed tightly. The culture plates were then placed upside down for 30 min at room temperature without agitation. Nonadherent cells were removed by discarding the medium and gently washing twice with PBS. The residual adherent cells were solubilized with 1% NP40 in PBS, and cell adhesion was estimated by measuring the fluorescence intensity of each well using a fluorescence microplate reader (Fluoroscan Ascent; Lab-systems, Helsinki, Finland).

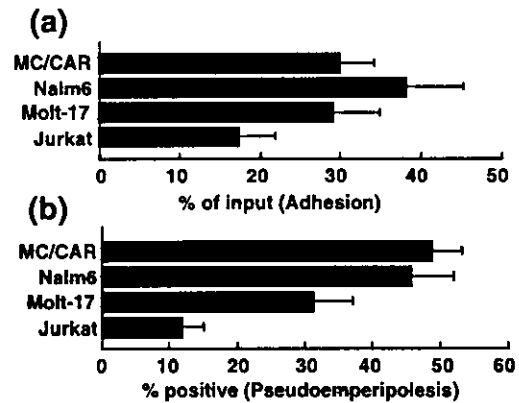
Cell transmigration

RA-SNC77 cells were plated into 12-well flat-bottomed culture plates (2×10^4 cells/well) and cultured for 2 days before use. Lymphocytes (1×10^6 cells/well) were plated onto the monolayer of RA-SNC77 cells with or without mAb, and were incubated for 2 hours. The lymphocytes bound to the surface of RA-SNC77 cells were removed by vigorous washing, and pseudoemperipoleosis was examined with an inverted phase-contrast microscope. RA-SNC77 cells with more than three lymphocytes underneath them were regarded as positive for pseudoemperipoleosis. At least 200 stromal cells were counted in each experiment.

IL-6 and IL-8 production by RA-SNC77 cells

MC/car cells (1×10^6 cells/well) were plated onto a monolayer of RA-SNC77 cells in 12-well culture plates that had been prepared as already described. The culture supernatants were harvested after 48 hours of coculture and, after removing the cells and debris by centrifugation,

Figure 1



Cellular interaction between human lymphoid cells and RA-SNC77 cells. (a) Adhesion between lymphoid cell lines and RA-SNC77 cells. Biscarboxyethyl carboxyfluorescein-labeled lymphoid cells (2×10^5 cells/well) were plated onto a monolayer of RA-SNC77 cells (1×10^4 cells/well) in a 96-well flat-bottomed culture plate. After 30 min of coculture, the nonadherent cells were removed and the fluorescence intensity of the adherent cells was measured. Results are expressed as the means \pm standard deviation of three different experiments. (b) Transmigration of lymphoid cell lines underneath RA-SNC77 cells. RA-SNC77 cells (2×10^4 cells/well) were cultured for 2 days in a 12-well culture plate. Lymphoid cells (1×10^6 cells/well) were plated onto a monolayer of RA-SNC77 cells and incubated for 2 hours. The lymphoid cells bound to the surface of the RA-SNC77 cells were removed, and the interaction between these cells was examined with a phase-contrast microscope. RA-SNC77 cells holding more than three lymphoma cells beneath them were defined as positive for transmigration. At least 200 RA-SNC77 cells were counted in each experiment. Results are expressed as the percentage of positive cells to total cells. Values are the means \pm standard deviation of three different experiments.

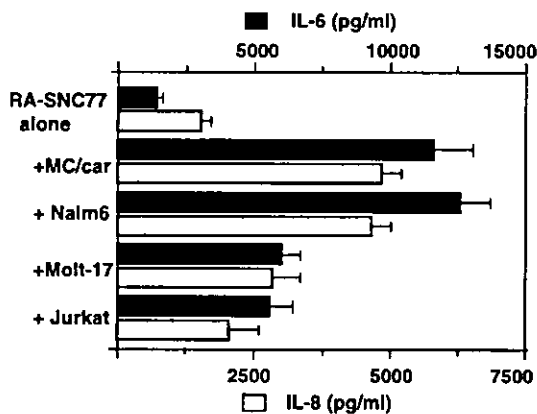
stored at -20°C until needed. Concentrations of IL-6 and IL-8 in the cell culture supernatants were measured using ELISA kits (Quantikine; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), according to the manufacturer's instructions.

Results

Enhanced cytokine production from RA-SNC77 cells by coculture with lymphoid cell lines

Various lymphoid cell lines bound well to the RA synovium-derived stromal cell clone RA-SNC77 (Fig. 1a). The lymphocyte binding occurred in 15 min and reached a plateau by 30 min. Bound lymphocytes subsequently transmigrated beneath the RA-SNC77 cells (pseudoemperipoleosis), and the transmigration reached its maximum level by 2 hours (Fig. 1b). As we previously demonstrated with synovial tissue-derived B cells [7], coculture with lymphoid cell lines provoked enhanced proinflammatory cytokine production from the RA-SNC77 cells, with varying degrees of induction (Fig. 2). Of the cell lines examined, the human B-cell lines MC/car and Nalm-6 showed the greatest ability to induce cytokine production

Figure 2



Cytokine production from RA-SNC77 cells cocultured with lymphoid cell lines. RA-SNC77 cells (2×10^4 cells/well) were cultured for 2 days in a 12-well culture plate. Lymphoid cells (1×10^6 cells/well) were then plated onto the monolayer of RA-SNC77 cells and further incubated for 48 hours. The culture supernatants were harvested, and the concentrations of IL-6 and IL-8 were determined.

by the RA-SNC77 cells, and MC/car cells were used for further analysis.

MC/car cells were positive for the expression of CD11a, CD18, CD29, CD49d, CD44, and CD54 (intercellular adhesion molecule 1), but were negative for CD49e and CD106 (VCAM-1) (Fig. 3). MC/car cells were also positive for integrin $\alpha4\beta7$ (data not shown) and a chemokine recep-

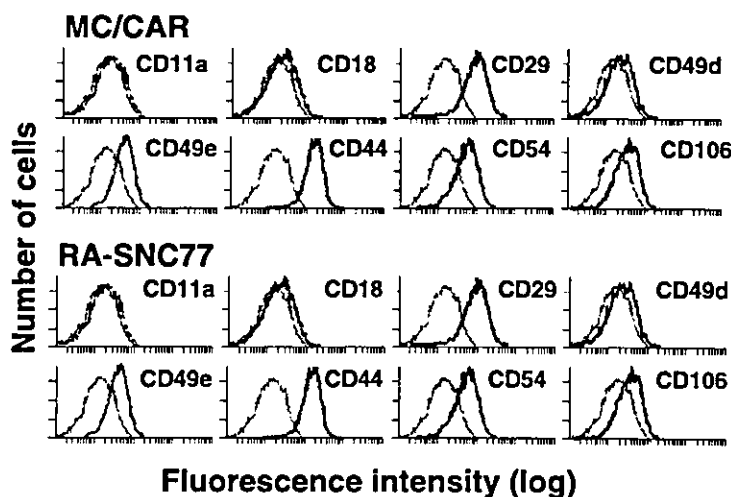
tor CXCR4 (Fig. 4). The RA-SNC77 cells were positive for CD29, CD49e, CD44, and CD54, and only weakly positive for CD106, but were negative for CD11a, CD18, and CD49d (Fig. 3). RA-SNC77 cells also expressed a CS-1 isoform of fibronectin and a chemokine SDF-1 α (Fig. 4).

Molecular events involved in MC/car cell binding to, and transmigration through, the RA-SNC77 cell layer

To investigate the contribution of various adhesion molecules to the adhesion of MC/car cells to RA-SNC77 cells, we used their respective neutralizing mAbs. Figure 5a shows that treatment with anti-CD29 (integrin $\beta1$ chain) or anti-CD106 (integrin $\alpha4$ chain) reduced adhesion of MC/car cells to RA-SNC77 cells mildly to moderately (percent of control \pm standard deviation, $82.7 \pm 3.1\%$ [$P < 0.05$] and $61.9 \pm 6.8\%$ [$P < 0.01$], respectively) but that anti-integrin $\alpha4\beta7$ was ineffective, indicating that integrin $\alpha4\beta1$ (VLA-4) on MC/car cells mediates, at least in part, cell adhesion to RA-SNC77 cells. In contrast, the mAb against CD106 (VCAM-1) did not inhibit MC/car cells binding to RA-SNC77 cells, suggesting that CD106 does not play a significant role in adhesion of MC/car cells, although its corresponding receptor ($\alpha4\beta1$ integrin) does. Other neutralizing mAbs against CD11a, CD18, CD44, CD49e, or CD54 showed no significant effects on MC/car cell binding (Fig. 5a). These results indicate that adhesion molecules, as yet undefined, mediate the remaining (~60%) MC/car cell adhesion to RA-SNC77 cells.

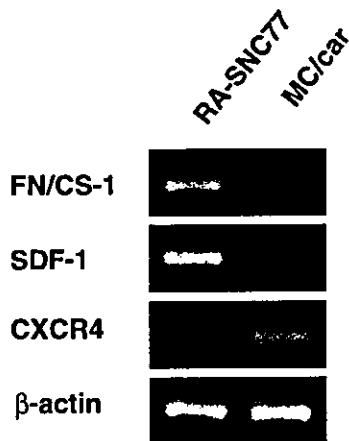
Because integrins and CD44 have been implicated in cell motility, we next investigated the role of $\beta1$, $\beta2$, and $\beta7$ integrins, as well as CD44, in the transmigration of

Figure 3



Surface expression of adhesion molecules by MC/car and RA-SNC77 cells. Cells were stained with the indicated mAb and analyzed on an Epics-XL flow cytometer. Isotype-matched antibody was used as a negative control.

Figure 4



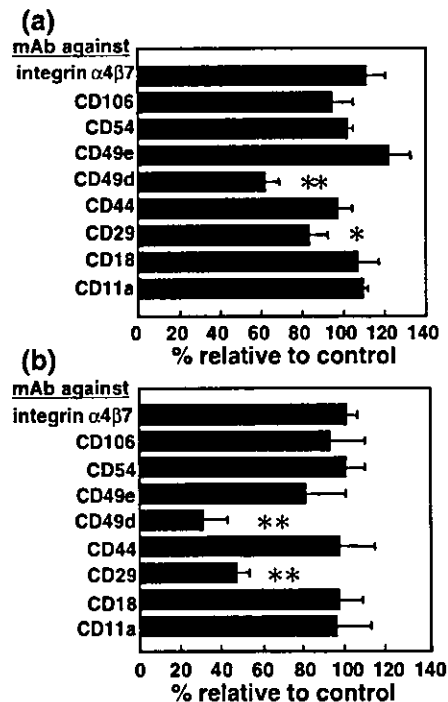
Expression of the connecting segment-1 isoform of fibronectin (FN/CS-1), SDF-1 and CXCR4 in RA-SNC77 cells and MC/Car cells. Agarose gel electrophoresis analysis of cDNA fragments amplified by PCR using primer pairs specific to the CS-1 isoform of fibronectin (307 bp), SDF-1 (230 bp), and CXCR4 (206 bp). β -Actin (275 bp) was used as a positive control.

MC/car cells underneath RA-SNC77 cells. Figure 5b shows that treatment with anti-CD29 (integrin β 1) or anti-CD49d (integrin α 4) significantly reduced the transmigration of MC/car cells ($46.7 \pm 6.1\%$ [$P < 0.01$] and $30.6 \pm 17.1\%$ [$P < 0.01$], respectively). Antibodies against CD11a, CD18, CD44, CD49e, CD54, CD106, and integrin α 4 β 1 showed no effect. These results suggest that integrin α 4 β 1 is important for the transmigration of MC/car cells underneath RA-SNC77 cells. The transmigration process was apparently Rho GTPase dependent, as shown in Fig. 6, since pretreatment of MC/car cells with the Rho-specific inhibitor C3 transferase significantly inhibited the transmigration of MC/car cells underneath RA-SNC77 cells in a dose-dependent manner, whereas the same treatment did not inhibit the adhesion of the MC/car cells at all. The inhibition of transmigration was apparently not due to changes in the expression of adhesion molecules, because C3 transferase treatment did not affect the cell surface expression of adhesion molecules including CD11a, CD18, CD29, CD49d, CD49e, CD44, and CD54 (data not shown).

Enhanced proinflammatory cytokine production by MC/car cells binding to RA-SNC77 cells

We previously reported that the production of various proinflammatory cytokines by RA-SNC cells was significantly enhanced on coculture with human B lymphocytes, and that direct cell-to-cell contact was necessary for the augmentation of the cytokine production by the RA-SNC cells [7]. However, the relative importance of lymphocyte binding and subsequent transmigration had not been evaluated.

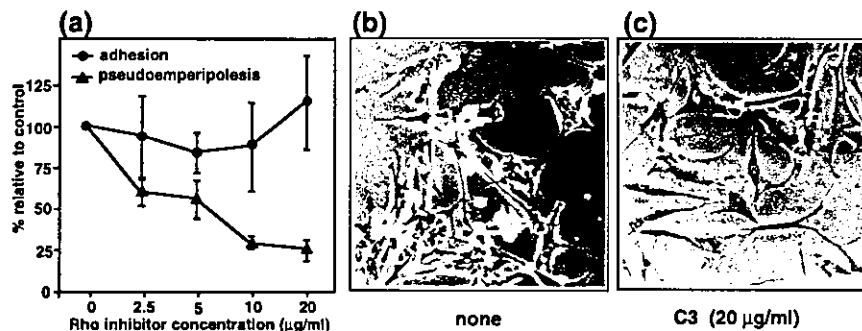
Figure 5



The effect of antibody treatment on adhesion and transmigration of MC/car cells. (a) Binding of MC/car to RA-SNC77 cells. Biscarboxyethyl carboxyfluorescein-labeled MC/car cells (2×10^5 cells/well) were plated onto a monolayer of RA-SNC77 cells (1×10^4 cells/well) with or without mAb (20 μ g/ml) in a 96-well flat-bottomed culture plate. After 30 min of coculture, nonadherent cells were removed and the fluorescence intensity was measured. Results are expressed as the means \pm standard deviation of three different experiments. * $P < 0.05$ compared with control, ** $P < 0.01$ compared with control. (b) Transmigration of MC/car cells underneath RA-SNC77 cells. MC/car cells (1×10^6 cells/well) were plated onto a monolayer of RA-SNC77 cells (1×10^4 cells/well) with or without mAb (20 μ g/ml) in a 12-well flat-bottomed culture plate. After 2 hours of coculture, MC/car cells bound to the surface of RA-SNC77 cells were removed, and the interaction between these cells was examined with a phase-contrast microscope. RA-SNC77 cells with more than three lymphoma cells beneath them were defined as positive. At least 200 RA-SNC77 cells were counted in each experiment. Results are expressed as the means \pm standard deviation of three different experiments. ** $P < 0.01$ compared with control.

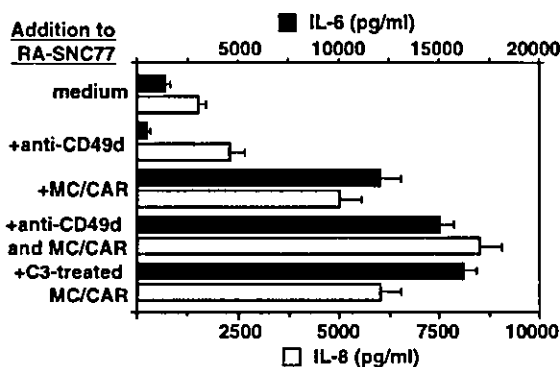
To investigate whether lymphocyte binding or transmigration, or both, play a role in this phenomenon, cytokine production by RA-SNC77 cells was examined using C3 transferase-treated MC/car cells, which are capable of cell adhesion but not of transmigration. RA-SNC77 cells produced comparable levels of IL-6 and IL-8 when cocultured with either untreated MC/car cells or C3-treated transmigration-defective MC/car cells (Fig. 7), suggesting that MC/car cell binding *per se* is sufficient to enhance the cytokine production in RA-SNC77 cells. However, the

Figure 6



The effect of C3 transferase on the adhesion and transmigration of MC/car cells. (a) MC/car cells were pre-incubated with C3 transferase at the indicated concentrations for 48 hours before coculture. Cellular adhesion and transmigration were evaluated independently, as described in Fig. 1. Values are means \pm standard deviation of three different experiments. (b) and (c) Phase-contrast micrographs of MC/car cells transmigrated underneath RA-SNC77 cells. Untreated (b) or C3-treated (c) MC/car cells were plated onto a monolayer of RA-SNC77 cells. After 2 hours incubation, MC/car cells bound to the surface of RA-SNC77 cells were removed by vigorous washing. Transmigrated MC/car cells showed phase-dense and flattered morphology.

Figure 7



The effect of anti-VLA-4 antibody and C3 transferase on cytokine production by RA-SNC77 cells. Supernatants were harvested at 48 hours of coculture of MC/car cells and RA-SNC77 cells, under the indicated conditions. Concentrations of IL-6 and IL-8 in the cell culture supernatants were measured using ELISA kits. Values are means of duplicate assays.

addition of anti-CD49d (integrin $\alpha 4$), which inhibited MC/car cell binding to RA-SNC77 cells by approximately 50%, showed no significant inhibitory effects on IL-6 and IL-8 production. This suggests that VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$)-independent lymphocyte adhesion induced the enhanced proinflammatory cytokine production by the RA-SNC77 cells.

Discussion

RA is characterized by chronic infiltration of T lymphocytes and B lymphocytes, plasma cells, and macrophages into the synovial tissue of joints [13,14]. High levels of pro-

inflammatory cytokines are invariably detectable in RA synovia with severe lymphocyte infiltration [14–18], suggesting that a signal(s) directing prolonged cytokine synthesis is present within the synovial tissues of RA patients. We previously established several RA-SNC cells that produce a large amount of proinflammatory cytokines on direct contact with lymphocytes [7]. In the present study, we focused on the mechanisms of the cell contact-mediated cytokine production by the RA-SNC cells, and examined, in particular, the adhesion pathways involved in the cell contact and the subsequent transmigration of the lymphocytes. We also attempted to verify whether cell adhesion or transmigration, or both, is important for the production of the proinflammatory cytokines by the RA-SNC cells.

To assess the relative contributions of cell binding and the subsequent transmigration of lymphocytes in this phenomenon, we took advantage of transmigration-defective MC/car cells pretreated with C3 transferase. The present results suggest that lymphocyte adhesion itself is sufficient, and that transmigration is not required, for induction of a high level of cytokine production by RA-SNC77 cells. In addition, since an anti-VLA-4 mAb did not affect cytokine production by RA-SNC77 cells at all, but significantly inhibited MC/car cell binding, our results suggest that one or more VLA-4-independent adhesion pathway is involved in the enhanced cytokine production by RA-SNC77 cells. Adhesion molecules previously identified in synovial tissues in RA patients, such as VAP-1 [19,20] and activated leucocyte cell adhesion molecule [21,22], do not appear to be involved in the binding of lymphocytes to RA-SNC77 cells, since flow cytometric analysis indicated a lack of expression of these adhesion molecules