

Fig. 2. 抗リボソーム P 抗体 (anti-P) による末梢血単球の TNF- $\alpha$  および IL-6 産生の増強効果

抗体が神経細胞に対して作用することにより、IFN- $\alpha$  や IL-6 の産生亢進に反映されるような神経細胞の機能異常が惹起され、CNS ループスの発症にいたるのではないかと考えられる。

抗神経細胞抗体の認識するエピトープについてはいまだ不明である。最近 SLE でみられる抗 DNA 抗体の中に神経細胞のグルタミン酸レセプターと反応するサブセットが同定され、この抗体をマウスの脳に注射したところ神経細胞のアポトーシスが誘発されたという<sup>9)</sup>。この抗体と CNS ループス患者髄液抗神経細胞抗体との異同については今後明らかにしていく必要がある。

### 3. CNS ループスの治療

治療の基本は副腎皮質ステロイドで、十分な効果が得られない場合は、ステロイドパルス療法、cyclophosphamide (エンドキサン) の投与 (経口あ

るいはパルス療法)などが行われる。近年抗 CD20 モノクローナル抗体 (rituximab (リツキサン)) が CNS ループスの治療において有効であるという報告がなされている<sup>10)</sup>。CNS ループスの病態に髄液中の抗神経細胞抗体が深く関与することを考えると、この rituximab の効果は非常に興味深い。

## 神経 Behçet 病

### 1. 臨床的特徴

Behçet 病における中枢神経病変は上矢状静脈洞血栓症などの血管病変に起因するものと (約 20%)、脳実質に起因するもの (約 80%) に大別され、後者を狭義の神経 Behçet 病 (NB) と呼ぶことが多い<sup>11)</sup>。一般に NB は、Behçet 病発症後数年を経た遷延期に出現し、血管病変と密接に関連する傾向がある。NB においては多彩な精神神経症状が出現するが、その主要な症候が小脳・脳幹部および大脳基底核の障害に基づく点に大きな特徴がある。また、NB は臨床的には急性型と慢性進行型の 2 型に分けられる。

### 2. 急性型 NB<sup>12)</sup>

急性型 NB は一般的に発熱を伴った髄膜脳炎の型をとる。これに片麻痺や脳神経麻痺などさまざまな脳局所徴候を伴うことが多いが、痴呆様の症状を認めることはまずない。障害部位は MRI の T2 強調画像やフレア画像において高信号域として描出される。髄液では、細胞数および蛋白の中等度以上の上昇を示す。細胞分画では好中球の割合が増加する。髄液 IL-6 活性も著明に上昇することが多く、この点で多発性硬化症と大きく異なる<sup>3)</sup>。Behçet 病の眼発作の抑制に有用である cyclosporin は NB 様の症状を誘発し、この場合発熱を伴う髄膜脳炎の型 (急性型 NB) をとることが多い。cyclosporin 誘発の中枢神経病変でも髄液 IL-6 の上昇が認められる。急性型 NB、とくに脳局所徴候が進行する症例に対しては速やかに中等量～大量の副腎皮質ステロイドの投与を行う。

### 3. 慢性進行型 NB (Table 2)<sup>12)</sup>

急性型 NB とは異なり、副腎皮質ステロイドな

Table 2. 慢性進行型神経 Behçet 病の特徴

patients	CNS manifestations	finding on MR scans
58, F	dementia, ataxia, dysarthria	scattered T2 high, Bs atrophy
68, M	dementia, ataxia, dysarthria	scattered T2 high, Bs atrophy
28, M	dementia, ataxia, dysarthria	Bs atrophy
35, M	psychosis	unremarkable
45, F	dementia, myclonus, ataxia, dysarthria	Cbr & Bs atrophy
48, M	dementia, ataxia, dysarthria	scattered T2 high, Bs atrophy
59, M	psychosis, ataxia	scattered T2 high, Bs atrophy
53, M	dementia, ataxia, dysarthria	scattered T2 high, Cbr & Bs atrophy
50, M	dementia, ataxia, dysarthria	Bs atrophy
53, M	dementia, ataxia, dysarthria	Cbr & Bs atrophy
37, M	dementia, ataxia, dysarthria	Cbr & Bs atrophy

Bs : brain stem, Cbr : cerebrum

[文献 12] より引用

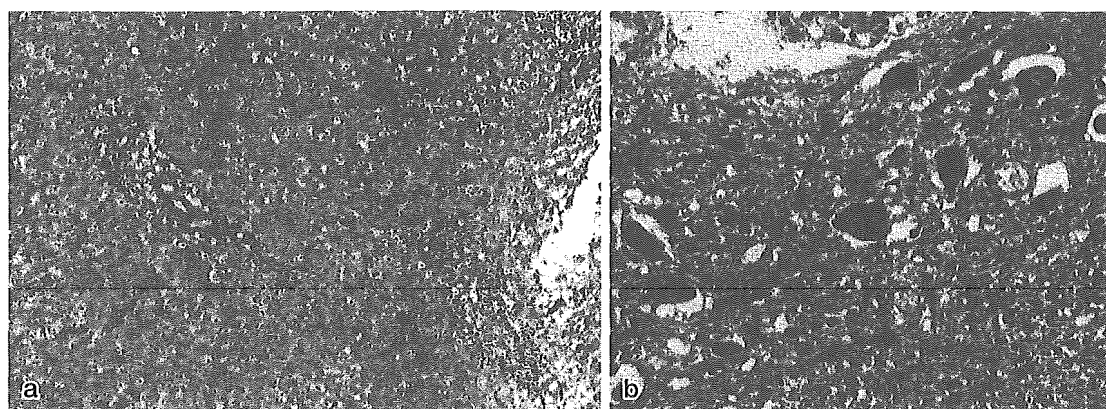


Fig. 3. 神経 Behçet 病患者の脳組織所見

HE 染色. a : 原倍率 25 倍, b : 原倍率 50 倍

どによる治療に抵抗して痴呆などの精神症状が進行し、ついには廃人同様になってしまう一群が存在することが強く認識され、慢性進行型 NB と呼ばれている<sup>12)</sup>。精神症状(痴呆・人格変化)・ataxia・構語障害をきたす頻度が高く、MRI では脳幹・小脳の萎縮や大脳の萎縮が認められる。

慢性進行性 NB の臨床的特徴は、急性型 NB に起因する脳局所徴候が先行症状として出現したあとに、数年のあいだをおいて痴呆・精神症状や構語障害・ataxia が徐々に進行し、ついには患者は廃人同様になってしまうという点である。また、HLA-B51 の陽性率が約 90% と高く、喫煙率もほぼ 100% である点も大きな特徴である。一方、髄

液中の細胞数・蛋白はごく軽度上昇するかあるいは正常であるにもかかわらず、髄液 IL-6 が数ヵ月以上持続して 0.1 U/ml (20 pg/ml) 以上の異常高値を示す<sup>13)</sup>。IL-6 の神経細胞に対する toxic effect は最近注目されており、髄液 IL-6 の持続的異常高値により、神経細胞の変性をきたすのではないかと考えられる<sup>13)</sup>。

慢性進行型 NB は副腎皮質ステロイドや cyclophosphamide は無効で、methotrexate (MTX) の少量パルス療法が有効である<sup>14)</sup>。

#### 4. NB の病理学的特徴

NB においては、CNS ループスとは対照的に大脳、脳幹、小脳に特徴のある病理学的変化が認め

られる。その病理学的特徴は、Fig. 3a に示すような毛細血管や細静脈周囲を中心とした脳実質への単核球、多核白血球の浸潤像が、脳幹・大脳基底核・大脳白質にわたって多発性に認められる点である (Fig. 3a)。脳実質に浸潤しているのは主として T リンパ球である。また、これらの炎症巣およびその周囲においては、神経細胞のアポトーシスも認められる<sup>3)</sup>。さらに、活動性の NB で死亡した患者の脳においてしばしば 2 核のニューロンがみられる (Fig. 3b)<sup>15)</sup>。このような 2 核のニューロンがいかなる機序で出現するのかは不明であるが、IL-6 などにより生じたニューロンの変性やアポトーシスなどが原因として考えられる。

### おわりに

以上、膠原病において痴呆様症状を示す頻度の高い CNS ループスと NB の病態を中心に概説した。CNS ループスにおいては、抗 P 抗体・抗神経細胞抗体といった自己抗体が病態形成に重要な役割を果たしていると考えられる。一方、NB における痴呆様中枢神経病変の発症には中枢神経内における持続的な IL-6 産生の異常亢進が重要な役割を果たすと考えられる。今後は、さらに詳細な機序について検討していく必要がある。

### 文献

- 1) ACR Ad Hoc Committee on Neuropsychiatric Lupus Nomenclature: The American College of Rheumatology nomenclature and classification and case definitions for neuropsychiatric lupus syndromes. *Arthritis Rheum* 42: 599, 1999
- 2) Hirohata S et al: A patient with systemic lupus erythematosus presenting both central nervous system lupus and steroid induced psychosis. *J Rheumatol* 15: 706,

1998

- 3) 廣畑俊成: 膠原病の難治性病態: 中枢神経病変. *日臨免疫会誌* 27: 109, 2004
- 4) Trysberg E et al: Intrathecal cytokines in systemic lupus erythematosus with central nervous system involvement. *Lupus* 9: 498, 2000
- 5) Trysberg E et al: Intrathecal levels of matrix metalloproteinases in systemic lupus erythematosus with central nervous system involvement. *Arthritis Res Ther* 6: R551, 2004
- 6) Hirohata S, Hayakawa K: Enhanced interleukin-6 messenger RNA expression by neuronal cells in a patient with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 42: 2729, 1999
- 7) Koren E et al: Autoantibodies to the ribosomal P proteins react with a plasma membrane related target on human cells. *J Clin Invest* 89: 1236, 1992
- 8) Nagai T et al: Antiribosomal P protein antibody in human systemic lupus erythematosus upregulates the expression of proinflammatory cytokines by human peripheral blood monocytes. *Arthritis Rheum* 52: 847, 2005
- 9) DeGiorgio LA et al: A subset of lupus anti-DNA antibodies cross-reacts with the NR2 glutamate receptor in systemic lupus erythematosus. *Nature Med* 7: 1189, 2001
- 10) Saito K et al: Successful treatment with anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab) of life-threatening refractory systemic lupus erythematosus with renal and central nervous system involvement. *Lupus* 12: 798, 2003
- 11) Kidd D et al: Neurological complications in Behçet's syndrome. *Brain* 122: 2183, 1999
- 12) 廣畑俊成: 神経ベーチェット病の病態. *臨神経* 41: 1147, 2001
- 13) Hirohata S et al: Cerebrospinal fluid interleukin-6 in progressive Neuro-Behçet's syndrome. *Clin Immunol Immunopathol* 82: 12, 1997
- 14) Hirohata S et al: Low dose weekly methotrexate therapy for progressive neuropsychiatric manifestations in Behçet's disease. *J Neurol Sci* 159: 181, 1998
- 15) 十束支朗ほか: 神経ベーチェット病の臨床病理学的研究. 厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班 昭和 57 年度研究業績, p125-128, 1982

# 神経Behçet病の臨床

Neuro-Behçet's disease



## 広畑 俊成

Shunsei HIROHATA

帝京大学医学部内科学教室

◎Behçet 病における中枢神経病変(NB)においては多彩な精神神経症状が出現するが、その主要な症候が小脳・脳幹部および大脳基底核の障害に基づく点に大きな特徴がある。このような神経病変の分布と寛解・増悪を繰り返す経過は、ときとして多発性硬化症と酷似し、鑑別の困難な場合がある。NB は大きく急性型と慢性進行型に分けられる。急性型 NB は一般的に発熱を伴った髄膜脳炎の型をとり、ときに片麻痺や脳神経麻痺などさまざまな脳局所徴候を伴う。障害部位は MRI の T2 強調画像やフレア画像において高信号域として描出される。シクロスポリン A(cyclosporin A)は急性型 NB 様の症状を誘発する。急性型 NB の治療の主体はステロイドである。慢性進行型 NB では痴呆様の精神神経症状がみられ、HLA-B51 の陽性率がきわめて高く、髄液 IL-6 の持続的異常高値を示す。ステロイド大量投与は無効で、メトトレキサート(methotrexate)の少量パルス療法が有効である。



Key Word : 神経Behçet病, シクロスポリンA, 慢性進行型, 髄液 IL-6, メトトレキサート

## 臨床的特徴

Behçet 病においては多彩な中枢神経病変がみられる。Behçet 病における中枢神経病変は、①上矢状静脈洞血栓症などの血管病変に起因するもの(約 20%)と、②脳実質の炎症性病変に起因するもの(約 80%)に大別される。前者はいわゆる血管 Behçet とよばれるべきものであり、後者を狭義の神経 Behçet 病(NB)とよぶことが多い<sup>1)</sup>。一般に NB は Behçet 病発症後数年を経た遷延期に出現し、血管病変と密接に関連する傾向がある<sup>2)</sup>。しかし、Behçet 病発症時より髄膜炎などの症状を呈する症例もまれではない。

NB においては多彩な精神神経症状が出現するが、その主要な症候が小脳・脳幹部および大脳基底核の障害に基づく点に大きな特徴がある<sup>2)</sup>。このような神経病変の分布(とくに脳幹・小脳の病変)と寛解・増悪を繰り返す経過はときとして多発性硬化症と酷似し、両者の鑑別の困難な場合がある。これまで NB の病型についてはいくつかの分類が試みられてきた。しかし近年、患者の治療反応性

と予後により NB は、臨床的に大きく急性型と慢性進行型の 2 型に分けられることが明らかになってきている<sup>3)</sup>。

## NBの診断

NB の診断においては、患者が Behçet 病の診断基準<sup>4)</sup>(1987 年厚生省特定疾患調査研究班あるいは国際診断基準)を満たしていることが前提となるべきである。Behçet 病と診断確定できない患者に対して NB と診断することは、十分慎重でなくてはならない。鑑別診断としては多発性硬化症が重要で、ときに鑑別の困難な場合がある。

## 急性型NB(表 1)<sup>3)</sup>

急性型 NB は一般的には発熱を伴った髄膜脳炎の型をとる。これに片麻痺や脳神経麻痺などさまざまな脳局所徴候を伴うことが多い。また、一方では発熱などの炎症所見が軽微で、脳局所徴候のみを示す場合もみられる。後者の場合は動脈硬化性の脳梗塞との鑑別のため、髄液検査で細胞数の

表 1 急性型神経Behçet病の臨床像<sup>3)</sup>

patients	CNS manifestations	finding on MRI scans	CyA
57 M	left hemiplegia	T2 high (right IC)	(-)
46 M	headache	not done	(+)
38 M	left hemiparesis	T2 high (right IC and Th)	(+)
59 F	right hemiparesis	T2 high (left IC)	(-)
17 M	headache	scattered T2 high	(+)
59 M	ataxia, dysarthria	T2 high (Bs and right IC)	(+)

CyA : cyclosporin A, IC : internal capsule, Th : thalamus, Bs : brain stem.

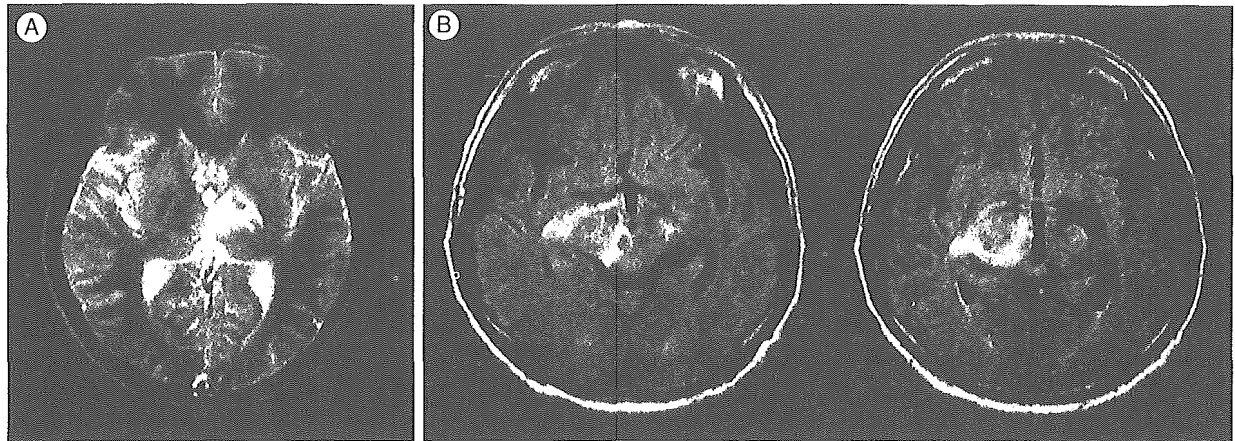


図 1 急性型神経Behçet病患者のMRI所見  
A : T2 強調画像, B : フレア画像

増多を確認する必要がある。また、まれに脳腫瘍を疑わせるような腫瘍性病変を呈する場合も報告されている<sup>5)</sup>。一般に、障害部位はMRIのT2強調画像やフレア画像においてhigh intensity lesionとして描出される(図1)。髄液検査では細胞数および蛋白の中等度以上の上昇を示す。細胞分画では好中球の割合が増加する。髄液のIL-6活性も著明に上昇することが多く、この点で多発性硬化症と大きく異なっている<sup>6)</sup>。

急性型NBの治療の主体は副腎皮質ステロイドである。とくに脳局所徴候が進行する症例に対しては速やかに中等量～大量の副腎皮質ステロイドの投与を行うことが重要である。一方、ステロイドを使用しなくても数日で自然寛解する場合もある<sup>7)</sup>。急性型NBの発作もBehçet病の他の主症状と同様に寛解・増悪を繰り返すことがよくみられる。

Behçet病の眼発作の抑制に有用であることが確認されているシクロスポリンA内服中の患者の約20%でNB様の症状を誘発することが知られ

ている<sup>8)</sup>。この場合、発熱を伴った髄膜脳炎の型(急性型NB)をとることが多い。急性型NBと同様に、さまざまな脳局所徴候や意識障害を合併することもある。シクロスポリンA誘発の中枢神経病変でも髄液IL-6の上昇が認められることより、免疫学的にもNBとの鑑別は難しい。また、臓器移植患者や原田病など他疾患患者ではシクロスポリンAによる神経症状は出現しないことより、シクロスポリンAが急性型NBを誘発すると考えるべきであろう。このような中枢神経症状はシクロスポリンAの中止だけで軽快する場合もあるが、中等量～大量の副腎皮質ステロイドの投与を必要とすることが多い。副腎皮質ステロイドに対する反応は良好で、self-limitingな経過をとることが多い<sup>3)</sup>。

### 慢性進行型NB(表2)<sup>3)</sup>

これまでもNBのなかには発熱などの炎症症状はないにもかかわらず、副腎皮質ステロイドなどによる治療に抵抗して痴呆などの精神症状が進

表 2 慢性進行型神経Behçet病の臨床像<sup>3)</sup>

patients	CNS manifestations	finding on MRI scans
58 F	dementia, ataxia, dysarthria	scattered T2 high, Bs atrophy
68 M	dementia, ataxia, dysarthria	scattered T2 high, Bs atrophy
28 M	dementia, ataxia, dysarthria	Bs atrophy
35 M	psychosis	unremarkable
45 F	dementia, myoclonus, ataxia, dysarthria	Cbr & Bs atrophy
48 M	dementia, ataxia, dysarthria	scattered T2 high, Bs atrophy
59 M	psychosis, ataxia	scattered T2 high, Bs atrophy
53 M	dementia, ataxia, dysarthria	scattered T2 high, Cbr & Bs atrophy
50 M	dementia, ataxia, dysarthria	Bs atrophy
53 M	dementia, ataxia, dysarthria	Cbr & Bs atrophy
37 M	dementia, ataxia, dysarthria	Cbr & Bs atrophy

Bs : brain stem, Cbr : cerebrum.

表 3 慢性進行型神経Behçet病11例のまとめ

clinical findings	
dementia/psychosis	11
ataxia	10
dysarthria	9
myoclonus	1
MRI findings	
atrophy	
brianstem/cerebellum	10
cerebrum	4
scattered T2 high lesions	5

行し、ついには廃人同様になってしまう一群が存在することが強く認識されてきた<sup>2)</sup>。こうした病型は急性型 NB に比べ、治療反応性と予後がまったく異なることから、近年、慢性進行型 NB とよばれて区別されるようになった<sup>3)</sup>。自験 11 例ではその臨床症状として精神症状(痴呆・人格変化)、ataxia、構語障害がそれぞれ 11 例、10 例、9 例にみられ、頻度が高かった(表 3)。これに一致して、MRI では脳幹・小脳の atrophy が 10 例に、また大脳の atrophy が 4 例に認められた(図 2)。T2 強調画像での散在性の小さな high intensity lesion は 5 例に認められたが、かならずしも慢性進行型 NB に特異的な変化ではなく、むしろこれらの変化は神経症状のない Behçet 病患者にも散見される。

慢性進行型 NB の臨床的特徴は、急性型 NB に起因する脳局所徴候が先行症状として一過性に出現した後に、数年の間をおいて痴呆・精神症状や構語障害、ataxia が出現し、これが徐々に進行し、ついには患者は廃人同様になってしまうという点である<sup>9)</sup>。患者の性別では男性に圧倒的に多く、

HLA-B51 の Behçet 病全体での陽性率はたかだか約 50% 強であるが、慢性進行型 NB においては自験 11 例中 9 例が HLA-B51 陽性であった<sup>3)</sup>。一方、髄液中の細胞数・蛋白はごく軽度上昇するかあるいは正常であるにもかかわらず、髄液 IL-6 活性が数カ月以上持続して異常高値を示すことが明らかになっている<sup>9)</sup>。これに対して、急性型 NB では症状の軽快とともに髄液 IL-6 活性は細胞数、蛋白と平行して低下する。一般的には慢性進行型 NB では髄液 IL-6 が 0.1 U/ml (20 pg/ml) 以上で長期間持続する<sup>9)</sup>。髄液 IL-6 値は細胞数、総蛋白、Q アルブミン値、血清 IL-6 のいずれとも有意の相関を示さず、中枢神経内で産生されていると考えられる<sup>9)</sup>。

慢性進行型 NB は副腎皮質ステロイドやシクロホスファミドなどでは寛解導入することは困難である。副腎皮質ステロイドを大量に使用して髄液所見が軽快しても、減量に伴ってかならず再発がみられることから、プレドニゾロン 10 mg/day 以上は使用するべきではない。

著者らは近年、メトトレキサートの少量パルス療法により髄液中 IL-6 が劇的に低下した症例を経験した。そこで、このメトトレキサートの少量パルス療法の慢性進行型 NB に対する有用性を検討するためにオープン試験を行った<sup>10)</sup>。その結果、メトトレキサート開始後(7.5~15 mg/wk) 12 カ月において投与前に比べ髄液 IL-6 は有意に低下し、症状の進行も認められなかった。副作用としては肝障害を示した例が数例みられたが、メトトレキサートの減量でいずれも軽快した。肝障害はメト

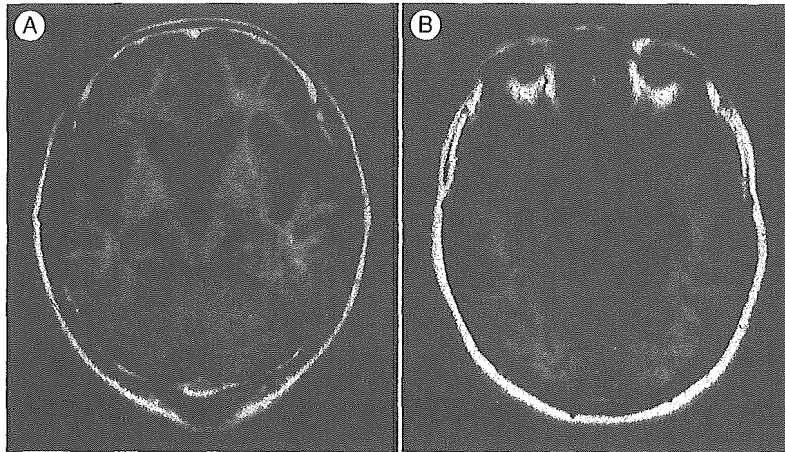


図 2 慢性進行型神経Behçet病患者のMRI所見(フレア画像)  
A: 大脳の萎縮, B: 脳幹小脳の萎縮.

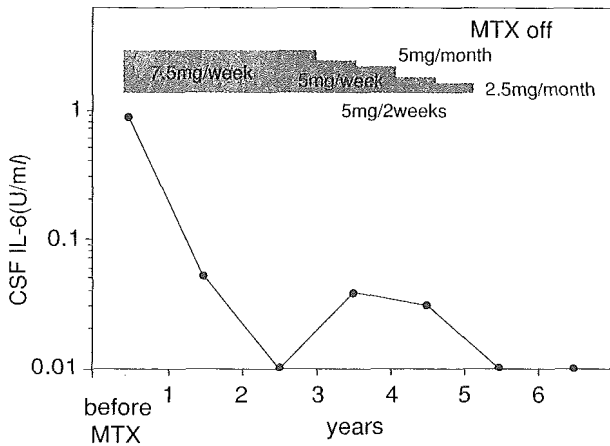


図 3 慢性進行型神経Behçet病でメトトレキサートを中止しえた代表例

トレキサートによる葉酸代謝阻害に基づくことが知られており、最近ではメトトレキサート内服 24～48 時間に folate 5 mg を内服させるよう推奨されている。投与開始 12 カ月後でメトトレキサートを中止した場合、その 6 カ月後にはほとんどの例で髄液 IL-6 の上昇とともに症状の再燃がみられたため、メトトレキサートを再開するに至っている<sup>10)</sup>。その後、髄液 IL-6 が低値のまま 2 年間以上持続した後に、髄液 IL-6 の値をみながらメトトレキサートを徐々に減量し、中止しえた症例を 2 例経験するに至っている(図 3)<sup>11)</sup>。この 2 例についてはメトトレキサート中止後 6 カ月以上経ても髄液 IL-6 の上昇はなく、症状の増悪もみられていない。したがって、メトトレキサート少量パルス療法は慢性進行型 NB の寛解導入療法として十分期待がもてる治療法であると考えられる。

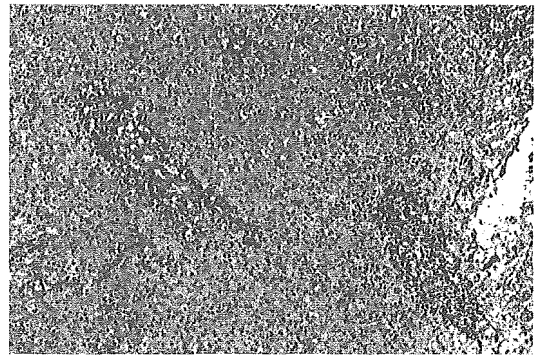


図 4 神経Behçet病患者の脳組織所見(H & E 染色, 原倍率×25)

### NBの病理学的特徴

NB においては、大脳、脳幹、小脳に特徴のある病理学的変化が認められる。その病理学的特徴は、図 4 に示すような毛細血管や細静脈周囲を中心とした脳実質への単核球、多核白血球の浸潤像が脳幹・大脳基底核・大脳白質にわたって多発性に認められる点である。脳実質に浸潤しているのは主として T リンパ球である。また、これらの炎症巣およびその周囲においては神経細胞のアポトーシスも認められる(図 5)<sup>12)</sup>。さらに、活動性の NB で死亡した患者の脳においてしばしば 2 核のニューロンがみられる<sup>13)</sup>。このような 2 核のニューロンがいかなる機序で出現するのかは不明であるが、IL-6 などにより生じたニューロンの変性やアポトーシスなどが原因として考えられる。

### 今後の問題点

慢性進行型 NB の病態を解明することは、

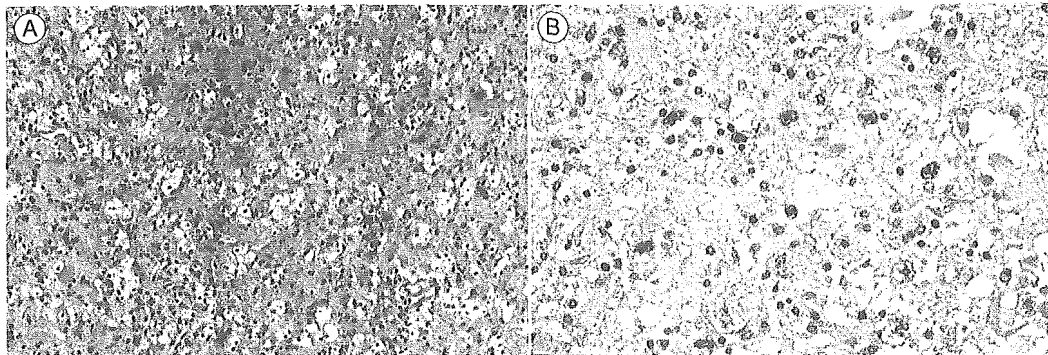


図 5 神経Behçet病患者の脳組織にみられた神経細胞のアポトーシス(原倍率×25)  
右側の Tunnel 染色でアポトーシスを起こした神経細胞が陽性に染まっている。

Behçet 病のなかでこの病態を示す患者の予後がもっとも悪いことからきわめて重要である。メトトレキサートが髄液 IL-6 を低下させ症状の進行を食い止める効果を有することが明らかになったが、今後はメトトレキサートの作用機序とともに髄液の IL-6 の持続性の上昇がいかなる機序で起こるかについて解明していく必要がある。また、メトトレキサートで効果不十分な症例についての対策も考えていく必要がある(「サイドメモ」参照)。さらに、急性型 NB から慢性進行型に移行するポイントをいかにして同定するか、また HLA-B51 がいかに病態形成に関与するかについても明らかにしていかななくてはならない。

一方、急性型 NB において、とくにシクロスポリン A が中枢神経病変を誘発する機序を明らかにすることは、NB そのものの発症機序を解明する重要な糸口になると思われる。

#### 文献

- 1) Kidd, D. et al.: Neurological complications in Behçet's syndrome. *Brain*, **122**: 2183-2194, 1999.
- 2) 広畑俊成: 神経ベーチェット症候群. *Brain Med.*, **3**: 375-381, 1991.
- 3) 広畑俊成: 神経ベーチェット病の病態. *臨床神経*, **41**: 1147-1149, 2001.
- 4) International Study Group for Behçet's Disease: Criteria for diagnosis of Behçet's disease. *Lancet*, **335**: 1078-1080, 1990.
- 5) Hirohata, S. et al.: Elevation of cerebrospinal fluid interleukin-6 activity in patients with vasculitides and central nervous system involvement. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **66**: 225-229, 1993.
- 6) 広畑俊成: 内科医のための脳疾患講座②膠原病その3—ベーチェット病. *Brain Med.*, **6**: 76-80, 1994.
- 7) Hirohata, S. et al.: Spontaneous remission of meningoencephalitis in Behçet's disease. *J. Rheumatol.*, **16**: 1283-1284, 1989.
- 8) Kotake, S. et al.: Central nervous system symptoms in patients with Behçet disease receiving cyclosporine therapy. *Ophthalmology*, **106**: 586-589, 1999.
- 9) Hirohata, S. et al.: Cerebrospinal fluid interleukin-6 in progressive neuro-Behçet's syndrome. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **82**: 12-17, 1997.
- 10) Hirohata, S. et al.: Low dose weekly methotrexate therapy for progressive neuropsychiatric manifestations in Behçet's disease. *J. Neurol. Sci.*, **159**: 181-185, 1998.
- 11) Kikuchi, H. et al.: Low dose MTX for progressive neuro-Behçet's disease. A follow-up study for 4 years. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **528**: 575-578, 2003.
- 12) Hirohata, S. et al.: Immunohistological studies in neuro-Behçet's disease. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **528**: 385-387, 2003.
- 13) 十束支朗・他: 神経ベーチェット病の臨床病理学

#### サイドメモ

#### 関節リウマチと慢性進行型神経 Behçet

関節リウマチ(RA)と慢性進行型神経 Behçet(NB)の2つの疾患は一見何の関係もないように見える。しかし、この2つには意外に共通点が多いのである。まず、両者ともに発症に遺伝的素因が関与している点である。RAはHLA-DR4、慢性進行型NBはHLA-B51と強い相関がみられる。また、RAも慢性進行型NBも副腎皮質ステロイドのみでは寛解導入できず、メトトレキサート少量パルス療法が有効である点、さらに両者とも徐々に進行して組織破壊をきたす点も共通している。また、炎症局所においてIL-6が高濃度に存在することも共通している。近年、RAの治療において抗TNF- $\alpha$ 抗体療法(infliximab)の有効性が強く認識されている。Behçet病の眼病変に対してもinfliximabが有効であることが証明されている。はたして、infliximabの慢性進行型NBに対する効果はどうかであろうか。



Hope for all people's health

人に、環境に、やさしい医薬品づくり。

肝臓疾患用剤・アレルギー用薬

(健保略称 強ミノC)

**強力ネオミノファゲン錠**®

グリチルリチン製剤 STRONGER NEO-MINOPHAGEN C

包装 20mL×10管、20mL×30管、5mL×5管、5mL×50管

薬価基準収載

肝臓疾患用剤・アレルギー用薬

**グリチロン錠**®

グリチルリチン製剤 GLYCYRON® Tab.

包装 100錠(PTP)、300錠(PTP)、500錠(PTP)、1,000錠(バラ)  
2,100錠(PTP)、5,000錠(PTP)

薬価基準収載

「効能・効果」、「用法・用量」、「禁忌を含む使用上の注意」等は、現品添付文書をご参照ください。\*資料は当社学術部担当者にご請求ください。

株式会社 **ミノファゲン** 製薬

資料請求先 〒107-0052 東京都港区赤坂8-10-22  
TEL 03(3402)6201(代)

03.12

# 中枢神経病変

広畑俊成

臨床リウマチ（日本臨床リウマチ学会雑誌）別冊

平成17年12月発行

Vol.17/No. 4

## 中枢神経病変

Key words: neuropsychiatric lupus erythematosus, 帝京大学医学部内科  
steroid psychosis, 広畑俊成  
cerebrospinal fluid,  
IL-6,  
treatment

### はじめに

膠原病の中でも、特に全身性エリテマトーデス (SLE) においては、多彩な中枢神経病変を呈する<sup>2)</sup>。これらの中枢神経病変は時として治療に難渋する場合が多く、いわゆる難治性病態の1つに掲げられている。アメリカリウマチ学会 (ACR) は1999年に SLE の精神神経症状の新分類基準<sup>1)</sup>を提唱し、中枢神経病変を、局所病変を主徴とする neurologic syndromes と高次脳機能異常を主徴とする diffuse psychiatric/neuropsychological syndromes の2つに分類し、さらに後者を5つの症状に分類している。表1に示すように、従来 organic brain syndrome と呼ばれていたものは acute confusional state の一部と cognitive disorder に相当すると考えられる<sup>2)</sup>。本稿においては、こうした SLE に見られる高次脳機能異常の治療について、これまでの自験例を提示しながら考えてみたい。

#### 1. SLE に起因する精神症状 (diffuse psychiatric/neuropsychological syndromes (ループス精神病) の診断

SLE の患者に精神症状が出現した場合、それが SLE に起因するもの (ループス精神病) であるかを診断するのは困難なことが多い。特に、副腎皮質ステロイドの開始後に精神症状が顕在

化した場合、副腎皮質ステロイドの副作用 (steroid psychosis) との鑑別が問題となる。さらに、ループス精神病と steroid psychosis の両者が合併することも少なくないことが問題を一層複雑にしている<sup>4)</sup>。これまでループス精神病においては髄液 IL-6 や IgG index の上昇することを我々は報告してきた<sup>3)5)</sup>。平成14年度~16年度の厚生労働科学免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業「免疫疾患の合併症とその治療法に関する研究」班において多施設共同研究を行い、転帰の明らかな過去10年間の81症例について ROC 解析を行った結果、髄液 IL-6 値 4.3 pg/ml をカットオフ値とした場合、感度87.5%、特異度92.3%でループス精神病的診断ができるという結果を得た<sup>6)</sup>。従って、現段階では、SLE 患者に精神症状が出現した場合、髄液 IL-6 によりある程度確度を持って診断を下すこと

表1 ループス精神病的旧分類と新分類の対応

Organic brain syndrome
Acute confusional state
Cognitive disorder
Non-organic psychosis
Acute confusional state
Anxiety disorder
Mood disorder
Psychosis

Central nervous system involvement.

Shunsei Hirohata.

Department of Internal Medicine, Teikyo University School of Medicine.

(2005. 7. 13 受付, 2005. 7. 29 受理)

ができるものと考えられる。但し、新たに発生した脳血管障害や感染性脳脊髄膜炎のある場合は、それだけで髄液 IL-6 は上昇するので、ループス精神病の診断マーカーとしては使用できない<sup>6)</sup>。

2. ループス精神病の治療 — 自験例のまとめ  
表 2 に1983年~2003年までのループス精神病

表 2 ループス精神病：自験例のまとめ (1983~2003)

患者	男性 4名 女性 16名 37.7±14.4歳 (Mean±SD)
症状	Acute confusional state 11(8)* Acute confusional state +Cognitive disorder 1 Cognitive disorder 3(1) Mood disorder 2 Psychosis 3
治療内容	Steroid のみ (プレドニゾロン30~80 mg/日) 12例 Steroid pulse 併用 8例 CPA or AZA 内服併用 2例 CPA pulse 併用 2例 Plasma exchange 併用 1例
予後	20例中 7例死亡 (発症後 1月~20年)

\* ( )内はけいれんを合併した例数  
CPA=cyclophosphamide, AZA=azathioprine

自験例20例のまとめを示す。精神症状としては acute confusional state を示すものが最も多く、また約半数の症例でけいれんを伴っていた。大半の症例は、副腎皮質ステロイド (パルスも含む) のみで治療され、免疫抑制剤を併用した症例は 4例のみであった。全20例中 7例が死亡している。

表 3 に死亡例の死因の内訳を示す。死亡例 7例のうち原病のコントロール不全によるものは 3例であり、このことより、大量の副腎皮質ステロイドと免疫抑制剤によってある程度の治療効果を上げることができると考えられる。治療の副作用によると考えられる死亡が 3例あつ

表 3 ループス精神病：死因の内訳

1. 原病のコントロール不全	3例
尿崩症の合併	1例
TTP の合併	1例
脳出血 (抗リン脂質抗体症候群にワーファリン併用)	1例
Cyclophosphamide 内服継続による malignancy	1例
急性心筋梗塞	1例
3. その他の合併症	1例
腸管のう気腫症によるイレウス	1例

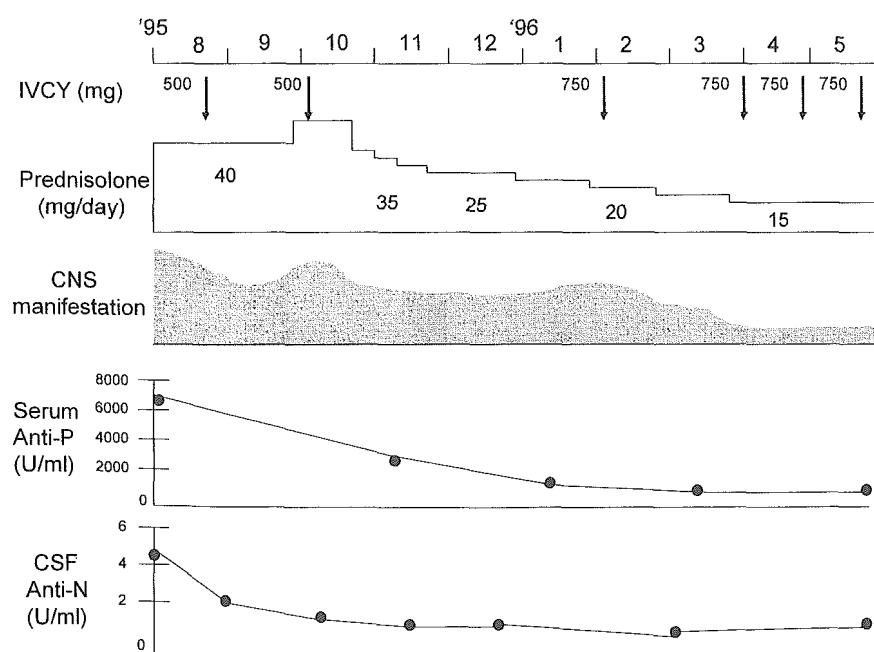


図 1 難治性のループス精神病の 1例(1)

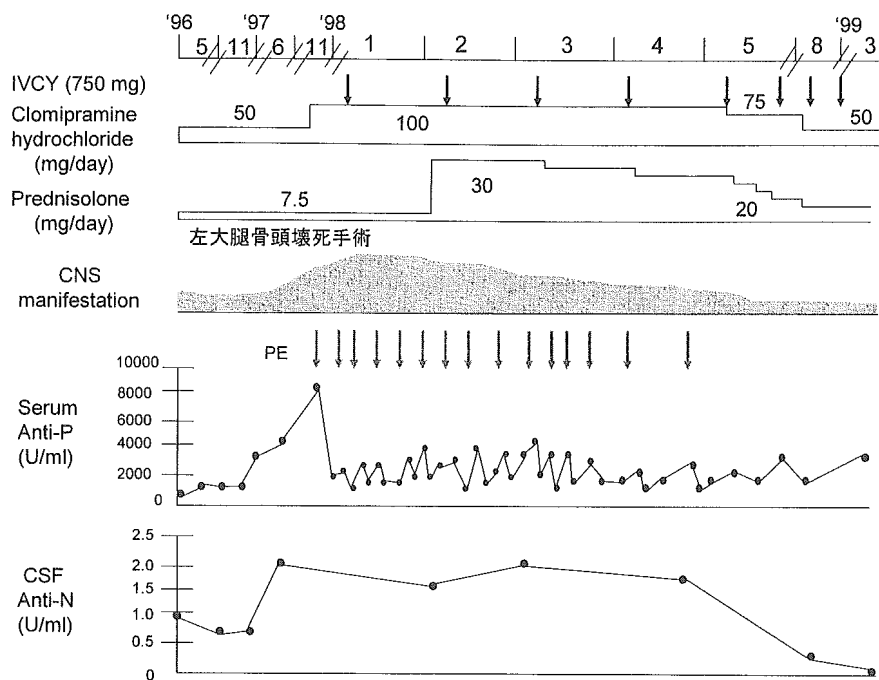


図2 難治性のループス精神病の1例(2)

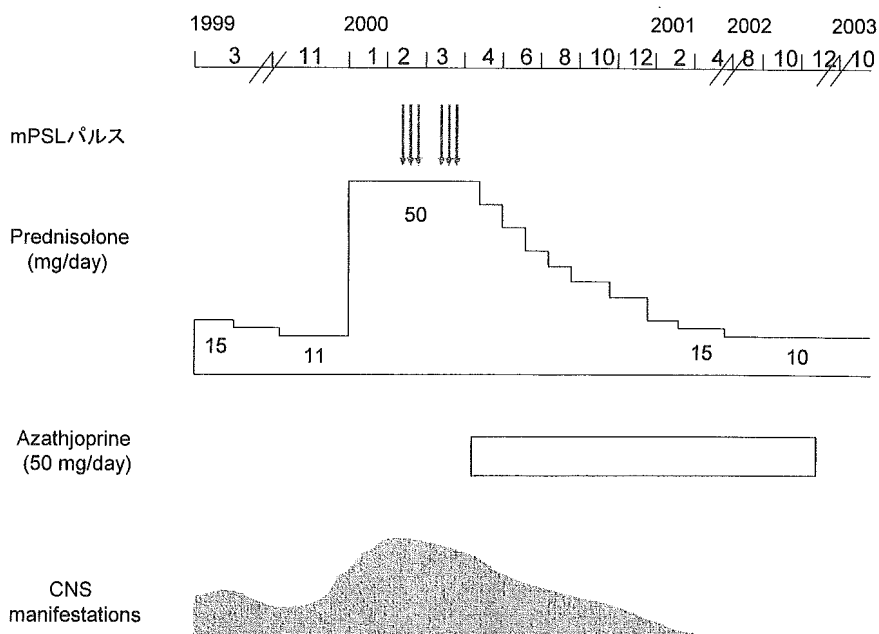


図3 難治性のループス精神病の1例(3)

た。このうちカリニ肺炎の1例はST合成による一次予防で発生は防げたと考えられる。また、シクロフォスファミド内服による malignancy の発生も、内服期間を一定期間以内（2年くらい）に限定することで予防可能と考えられる。急性心筋梗塞は、ループス精神病にかかわらず、SLE の治療一般における副腎皮質ステロイドによる動脈硬化予防という問題を提起するものである。総コレステロール値の上昇する例では

statin 系薬剤を投与すべきと考えられるが, evidence を作ってゆく必要がある。

図1～図3にシクロフォスファミドパルス療法と血漿交換療法を施行したループス精神病 (mood disorder) の1症例の経過を示した。1995年8月～1996年5月までは内服プレドニゾロンとシクロフォスファミドパルス療法を施行しある程度軽快したが、コントロールは完全ではなかった(図1)。1996年5月大腿骨頭無腐性

壊死に対する左大腿骨頭置換術を契機に、血清抗リボソームP抗体、髄液抗神経細胞抗体の上昇とともに精神症状の増悪をきたした。血漿交換療法を繰り返し、シクロフォスファミドパルスを開するも改善せず、結局副腎皮質ステロイドの増量によりデータの改善とともに症状も軽快し、塩酸クロミプラミン（抗うつ薬）の減量もできた（図2）。しかし、1999年11月に再発し、内服プレドニゾロンの増量とステロイドパルス療法に加え、アザチオプリン内服を2年間併用し、これによって寛解導入に成功し、以後約3年に亘って再発は見られていない（図3）。本症例からは、難治性のループス精神病に対しては、少なくとも十分量の副腎皮質ステロイドを使用した上で、アザチオプリン内服を行うことが、シクロフォスファミドパルス療法や血漿交換療法よりも有効であることが示唆される。

これまでSLEによる精神神経病変の治療として色々な方法が報告されている。表4に平成14年度~16年度厚生労働科学免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業「全身性自己免疫疾患における難治性病態の診断と治療法に関する研究」班において作成したガイドラインを示す<sup>7)</sup>。

表4 CNS ループスの治療ガイドライン

治療法	神経症状		
	精神症状	横断性脊髄炎	その他
Steroid 内服	A	A	B
Steroid pulse	B	B	B
Cyclophosphamide pulse	B		B
Steroid pulse +cyclophosphamide pulse		B	
免疫抑制剤内服	B		
血漿交換療法	C	C	
Steroid+methotrexate の 髄腔内投与	C	C	C
抗 CD20 抗体(Rituximab)	C	C	
自家骨髄幹細胞移植	C	C	

ガイドラインにおける推奨の強さの分類

推奨A 行うよう強く勧められる

推奨B 行うよう勧められる

推奨C 行うよう勧められるだけの根拠が明確でない

推奨D 行わないよう勧められる

ループス精神病の治療として最も効果の確実なものは副腎皮質ステロイドであり、一般的に大量のプレドニゾロン（1 mg/kg 体重）を使用する。ステロイドパルス療法やシクロフォスファミドパルス療法の有効性を示す報告は多いが、コントロール試験でその有用性を証明したものは1つもない。近年、リツキシマブ（抗CD20モノクローナル抗体）の有効性を示す報告がなされており、今後の臨床応用が期待される<sup>8)</sup>。

## おわりに

以上、SLE に起因する精神症状の診断とその治療について、自験例をまじえて概説した。副腎皮質ステロイドと免疫抑制剤による治療で35%の死亡例が出ている。SLEの10年生存率が90%を越える現在、この数字は決して満足できるものではない。現在、SLEの治療としてリツキシマブが大きな注目を集めている。その効果だけでなく、副腎皮質ステロイドや免疫抑制剤に比して重篤な副作用の少ないことも大きな魅力である。今後、SLEの中樞神経病変に対してもリツキシマブの有用性を検討してゆくことが、この難治性病態の克服に向けて重要な課題であると考えられる。

## 文 献

- 1) ACR Ad Hoc Committee on Neuropsychiatric Lupus Nomenclature: The American College of Rheumatology nomenclature and case definitions for neuropsychiatric lupus syndromes. *Arthritis Rheum.*, 42: 599-608, 1999.
- 2) Harris, E.N., Hughes, G.R.V.: Cerebral disease in systemic lupus erythematosus. *Springer Semin. Immunopathol.*, 8: 251-266, 1985.
- 3) Hirohata, S., Hirose, S., Miyamoto, T.: Cerebrospinal fluid IgM, IgA, and IgG indexes in systemic lupus erythematosus. Their use as estimates of central nervous system disease activity. *Arch. Intern. Med.*, 145: 1843-1846, 1985.

- 4) Hirohata, S., Iwamoto, S., Miyamoto, T., et al.: A patient with systemic lupus erythematosus presenting both central nervous system lupus and steroid induced psychosis. *J. Rheumatol.*, 15 : 706-710, 1988.
- 5) Hirohata, S., Miyamoto, T.: Elevated levels of interleukin-6 in cerebrospinal fluid from patients with systemic lupus erythematosus and central nervous system involvement. *Arthritis Rheum.*, 33 : 644-649, 1990.
- 6) 広畑俊成：ループス精神病の分類基準。厚生労働科学免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業 免疫疾患の合併症とその治療法に関する研究 「診療ガイドライン」, pp. 8-13, 2005.
- 7) 広畑俊成：第2章 難治性神経筋疾患 I. CNS ループス。厚生労働科学免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業 全身性自己免疫疾患における難治性病態の診断と治療に関する研究 「全身性自己免疫疾患における難治性病態の診療ガイドライン」, pp. 5-9, 2005.
- 8) Saito, K., Nawata, M., Nakayamada, S., et al.: Successful treatment with anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab) of life-threatening refractory systemic lupus erythematosus with renal and central nervous system involvement. *Lupus*, 12 : 798-800, 2003.

ORIGINAL ARTICLE

Konagi Tanaka · Toshihito Mori · Takuo Juji  
Satsuki Suzuki · Junko Watanabe · Akihito Goto  
Noriyuki Shiobara · Shoji Yamane · Naoshi Fukui  
Ryuji Suzuki · Takahiro Ochi

## Production of interleukin-6 and interleukin-8 by nurse-like cells from rheumatoid arthritis patients after stimulation with monocytes

Received: April 28, 2005 / Accepted: October 12, 2005

**Abstract** It has been reported that nurse-like cells (NLCs) play a critical role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis (RA). The interaction between NLCs established from RA patients (RA-NLCs), and freshly isolated blood monocytes was analyzed to further elucidate the pathogenesis of RA. RA-NLC lines were established from the synovium of RA patients. The RA-NLCs were cultured with monocytes freshly isolated from peripheral blood of healthy donors, and induction of interleukin (IL)-6 and IL-8 as well as the mRNA expression of these cytokines was examined. The levels of IL-6 were over 400 times higher in the supernatant from coculture of RA-NLCs and monocytes than in those from cultures of RA-NLCs alone. Anti-tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  monoclonal antibody inhibited the induction of both cytokine in a dose-dependent fashion, although there was no detectable level of TNF- $\alpha$  in the supernatant from coculture. In addition, coculture of RA-NLCs and monocytes without direct cell contact did not induce

cytokine production. To determine IL-6 producing cells, RA-NLCs and monocytes were separated into each fraction after coculture for 24 h. Cocultured RA-NLCs contained approximately 80 times higher IL-6 mRNA than the RA-NLCs cultured alone. The levels of IL-8 were also much higher (about 900 times) in the supernatant from coculture than in those from cultures of RA-NLCs alone. Cocultured RA-NLCs expressed IL-8 mRNA about 620 times higher than those cultured alone. These results indicate that NLCs produce high levels of IL-6 and IL-8 after cell–cell interaction with monocytes/macrophages via membrane-bound TNF- $\alpha$ , and that activation of NLCs by monocytes/macrophages may be involved in the pathogenesis of RA through maintenance of synovial inflammation.

**Key words** Inflammatory cytokine · Monocyte · Nurse-like cell (NLC) · Rheumatoid arthritis (RA)

K. Tanaka · A. Goto · N. Shiobara · S. Yamane · R. Suzuki (✉) · T. Ochi

Department of Rheumatology and Clinical Immunology, Clinical Research Center for Rheumatology and Allergy, National Hospital Organization Sagamihara National Hospital, 18-1 Sakuradai, Sagamihara 228-8522, Japan  
Tel. +81-42-742-7400; Fax +81-42-742-7990  
e-mail: r-suzuki@sagamihara-hosp.gr.jp

T. Mori · T. Juji  
Department of Orthopaedics, Clinical Research Center for Rheumatology and Allergy, National Hospital Organization Sagamihara National Hospital, Sagamihara, Japan

S. Suzuki  
Section of Biological Science, Research Center for Odontology, Nippon Dental University, Tokyo, Japan

J. Watanabe  
Department of Rheumatology, Clinical Research Center for Rheumatology and Allergy, National Hospital Organization Sagamihara National Hospital, Sagamihara, Japan

N. Fukui  
Department of Pathomechanism, Clinical Research Center for Rheumatology and Allergy, National Hospital Organization Sagamihara National Hospital, Sagamihara, Japan

### Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is an inflammatory disease characterized by systemic arthritis with proliferation of synovium and destruction of bones and cartilage. It is known that macrophage-like synovial cells (type A cells) and fibroblast-like synovial cells (type B cells) as well as T and B lymphocytes produce a large amount of cytokines and contribute to the inflammation in the affected synovium.<sup>1</sup> The etiology of RA is, however, not clearly understood.

The nurse cell was originally reported by Weckerle et al. in 1980,<sup>2,3</sup> as a stromal cell from murine thymus holding thymocytes under itself in vitro. This phenomenon was named pseudoemperipolesis. Nurse cells are believed to play an important role in differentiation, maturation, and apoptosis of thymocytes. Human stromal cell, which demonstrates pseudoemperipolesis, was detected in the skin of healthy donors, RA synovium, and RA bone marrow by our group, and named nurse-like cell (NLC),<sup>4-6</sup> Nurse-like cells isolated from RA patients were designated as RA-NLC.



RA-NLCs demonstrate pseudoemperipolesis with T and B lymphocytes and interact with them. RA-NLCs promote the survival of T and B cells *in vitro*, activate them to produce cytokines, and induce production of immunoglobulin by B cells.<sup>4,6,7</sup> RA-NLCs are believed to contribute to the pathogenesis and persistence of inflammation in RA.<sup>4</sup>

Multiple inflammatory cytokines are known to be produced by various types of cells such as infiltrating T and B lymphocytes and monocytes/macrophages in the inflammatory synovial tissues.<sup>8</sup> Several studies have reported that interaction between synoviocytes and T lymphocytes promoted cytokine production.

Bombara et al.<sup>9</sup> reported that cell contact between fibroblast-like synoviocytes (FLSs) and T lymphocytes induced the expression of adhesion molecules, VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1, CD106) and ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1, CD54) on FLSs and the production of tumor necrosis factor (TNF), interferon (IFN)- $\gamma$ , and interleukin (IL)-6. Min et al.<sup>10</sup> reported that coculture of rheumatoid synovial fibroblasts and type II collagen-reactive T cells induced the expression of IL-8, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), and macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) mainly by cell-cell contact through CD40 ligand-CD40 engagement.

Interaction between RA synoviocytes and B lymphocytes has also been reported. Shimaoka et al.<sup>7</sup> reported that NLCs from bone marrow and synovium of RA patients promoted the survival of human B cells and enhanced the function. Takeuchi et al.<sup>4</sup> demonstrated that coculture of RA-NLCs and B cells induced the production of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , and enhanced the production of IL-6, IL-8, and granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), the proliferation of B cells, and Ig production. Reparon-Schuijt et al.<sup>11</sup> reported that survival of synovial B cells was regulated by VCAM-1 expressed on FLSs in RA patients. Takeuchi et al.<sup>12</sup> demonstrated VLA-4-dependent and -independent pathways in the proinflammatory cytokine production by synovial NLCs from RA patients through cell-cell contact with MC/car, a human B-cell line. Recently our group reported that B-cell clones, obtained when RA-NLCs were established, proliferated depending on the presence of RA-NLCs and that each clone produced immunoglobulin, which recognizes human stromal cell lines from various tissues.<sup>13</sup>

Rheumatoid arthritis synoviocytes and monocytes/macrophages also interact. Our group reported that monocytes cultured with RA-NLCs differentiated into osteoclast precursors, which became multinucleated bone resorbing cells, *i.e.*, osteoclasts, when supplemented with IL-3, IL-5, IL-7, granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF), or a combination of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$  B ligand (RANKL) and macrophage-colony stimulating factor (M-CSF).<sup>14</sup>

In the present study, we analyzed the interaction between RA-NLCs and monocytes/macrophages. Interaction between RA-NLCs and monocytes/macrophages requires direct cell-cell contact and induces inflammatory cytokines probably via membrane-bound TNF- $\alpha$ . The results suggest that this interaction plays an important role not only in

destruction of joints but in induction and persistence of inflammation in RA patients.

## Patients and methods

### Patients

Synovial tissues were collected with informed consent from patients with RA or osteoarthritis (OA) who had undergone arthroplasty at the National Hospital Organization Sagamihara National Hospital. All patients with RA satisfied the 1987 revised diagnostic criteria of the American College of Rheumatology (formerly the American Rheumatism Association).<sup>15</sup> The patients with OA were diagnosed according to the ACR clinical and radiographic criteria for OA of the knee.<sup>16</sup>

### Establishment of NLCs and FLSs from synovial tissues

RA-NLCs were established from the synovium of RA patients according to the procedure previously reported.<sup>4</sup> Fibroblast-like synoviocytes were similarly established from synovium of OA patients and named as OA-FLSs. Briefly, tissue specimens were finely minced and digested with a cocktail of enzymes consisting of 0.1% hyaluronidase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 0.1% type II collagenase (Sigma-Aldrich), and 0.01% DNase (Sigma-Aldrich) for 1 h in a shaking water bath at 37°C. The digested tissue specimens were filtered with a 100- $\mu$ m-diameter nylon filter (Cell Strainer; BD Biosciences Discovery Labware, MA, USA) and washed twice with Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS; Invitrogen, Tokyo, Japan). The cell pellets were resuspended in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS; Thermo Trace, Melbourne, Australia), 100 units/ml penicillin G sodium, 100  $\mu$ g/ml streptomycin sulfate, and 2 mM L-glutamine (Invitrogen), and seeded into a tissue-culture flask (Asahi Techno Glass, Tokyo, Japan). Nonadherent cells were removed and adherent cells were maintained in humidified air containing 7.5% CO<sub>2</sub> at 37°C. The medium was changed twice a week and the cells were passaged when they became confluent. Homogeneous populations of stromal cells were obtained during several passages. Twelve RA-NLC and five OA-FLS lines were established from the synovium from RA and OA patients, respectively. Two RA-NLC and three OA-FLS lines were selected and used after 3-6 passages in the experiments.

To examine the ability of pseudoemperipolesis,  $1 \times 10^4$  RA-NLCs or OA-FLSs were cocultured with  $4 \times 10^5$  MOLT17 cells, a human lymphoma cell line (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) or MC/car cells, a human B-cell line (American Type Culture Collection). After 6 h of coculture, the medium was changed gently to remove nonadherent cells. Pseudoemperipolesis was determined to be positive when more than three lymphoma cells were detected under one RA-NLC or OA-FLS.

Cells located beneath a synovial cell (an RA-NLC or an OA-FLS) (pseudoemperipolexis) looked like dark round cells inside of the outline of the synovial cell body, whereas cells which attached only to a cell body or a dendritic process of a synoviocyte looked like bright round cells and were easily washed out by a pipetting medium. Two hundred synoviocytes were counted in each experiment.

#### Coculture of RA-NLCs and peripheral blood cells

Peripheral blood samples were collected from RA patients and healthy adults with informed consent. The specimens were immediately heparinized, overlaid on 5 ml of Lymphocyte Separating Medium (LSM; ICN Biomedicals, Aurora, OH, USA), and centrifuged at 3000 rpm for 30 min at room temperature. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were collected and washed twice with HBSS. Monocytes, CD14-negative cells, and T and B lymphocytes were isolated from PBMCs using anti-CD14, -CD3, and -CD19 antibody-conjugated MACS beads (MACS; Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany), respectively, according to the manufacturer's instructions. The purity of each fraction was examined using FACSCalibur (Nippon Becton Dickinson, Tokyo, Japan) after staining with respective antibodies conjugated with phycoerythrin (PE) or fluorescein isothiocyanate (FITC) (CD14-PE, CD3-FITC, and CD19-PE; Nippon Becton Dickinson). Briefly,  $5 \times 10^5$  cells of each fraction was resuspended in 100  $\mu$ l of the medium, and 4  $\mu$ l of respective fluorescent antibody was added and incubated on ice for 30 min. After centrifugation at 11000 rpm for 10 s, the supernatant was removed. The cells were resuspended in 500  $\mu$ l of medium for examination with FACSCalibur. The purities were greater than 95%.

To examine cytokine production,  $1 \times 10^3$  RA-NLCs and  $4 \times 10^4$  monocytes, T or B lymphocytes, or CD14-negative cells in 200  $\mu$ l of the medium were dispensed to each well of a 96-well plate. In addition, to investigate if TNF- $\alpha$  was involved in the induction of cytokines,  $1 \times 10^3$  of RA-NLCs and  $4 \times 10^4$  monocytes were cultured in 200  $\mu$ l of the medium in each well of a 96-well plate, with or without anti-TNF- $\alpha$  neutralizing monoclonal antibody at 0.01, 0.1, or 1  $\mu$ g/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Furthermore,  $1 \times 10^4$  RA-NLCs were cultured with or without  $4 \times 10^5$  monocytes on a Millicell culture plate insert (Nihon Millipore, 0.45- $\mu$ m pore; Kogyo, Yonezawa, Japan) or cocultured with the same number of monocytes without Millicell in each well of a 24-well plate. Cells were cultured for 72 h at 37°C in humidified air containing 7.5% CO<sub>2</sub>, and the supernatant fluids were collected and stored at -20°C until use.

To quantitate the mRNA of cytokines,  $3 \times 10^5$  RA-NLCs and  $7 \times 10^6$  monocytes were dispensed into each well of a 6-well plate. Cells were cocultured or cultured alone for 24 h. The cells were collected after trypsin/EDTA treatment (Cambrex Bio Science Walkersville, Walkersville, MD, USA) and separated into two populations, monocytes and RA-NLCs, using CD14 antibody-conjugated MACS beads.

#### Quantification of cytokines

Levels of inflammatory cytokines, IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$  were determined in culture supernatant, using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (BioSource International, Camarillo, CA, USA).

The levels of mRNA of IL-6 and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) were assessed in RA-NLCs, monocytes (cultured alone, respectively), and a mixture of these cells after a coculture. A conventional reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) procedure was performed using Premix Tag (TaKaRa, Shiga, Japan) and LightCycler Primer Set (search-LC, Heidelberg, Germany) of human IL-6 and human GAPDH with an annealing temperature of 60°C and amplification by 25 cycles for IL-6 and 20 cycles for GAPDH.

Moreover, the levels of mRNA of IL-6, IL-8, and GAPDH were assessed in RA-NLCs and monocytes by quantitative RT-PCR (LightCycler, Roche Diagnostics, Tokyo, Japan) using LightCycler Primer Set of human IL-6 and human GAPDH, LightCycler FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR Green I (Roche Diagnostics), according to the manufacturer's instructions. GAPDH was used as an internal control.

#### Statistical analysis

The difference in the percentage of pseudoemperipolexis-demonstrating cells was compared between RA-NLCs and OA-FLSs by analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni test. These statistical methods were also used to compare the levels of cytokine production among the RA-NLCs cultured alone and those cocultured with PBMCs or a fraction of PBMCs. The levels of IL-6 and IL-8 production were compared between cocultured RA-NLCs and RA-NLCs cultured alone, and between cultures with and without anti-TNF- $\alpha$  monoclonal antibody (mAb) by ANOVA and Bonferroni test. The levels of IL-6 production were compared between RA-NLCs and OA-FLSs by unpaired *t*-test. The cytokine levels were compared between coculture of RA-NLCs and monocytes with and without Millicell by ANOVA and Bonferroni test. A *P* value of less than 0.05 was considered statistically significant.

## Results

Twelve RA-NLCs and five OA-FLSs were established from synovium from patients with RA and those with OA, respectively. RA-NLC lines demonstrated a higher percentage of pseudoemperipolexis ( $76\% \pm 12\%$  with MOLT-17,  $84\% \pm 19\%$  with MC/car) than OA-FLS lines ( $5\% \pm 3\%$  with MOLT-17,  $7\% \pm 4\%$  with MC/car) (Table 1).

Two RA-NLCs and three OA-FLSs were selected based on the average ability of pseudoemperipolexis and used after 3–6 passages in the experiments. RA-NLCs were cultured with PBMCs for 72 h, and the levels of IL-6 in the

culture supernatant were assessed. The levels of IL-6 were 10 times higher ( $P < 0.01$ ) in the supernatant from coculture of RA-NLCs (RA275SY) and PBMCs than in those from cultures of RA-NLCs or PBMCs cultured alone (Fig. 1).

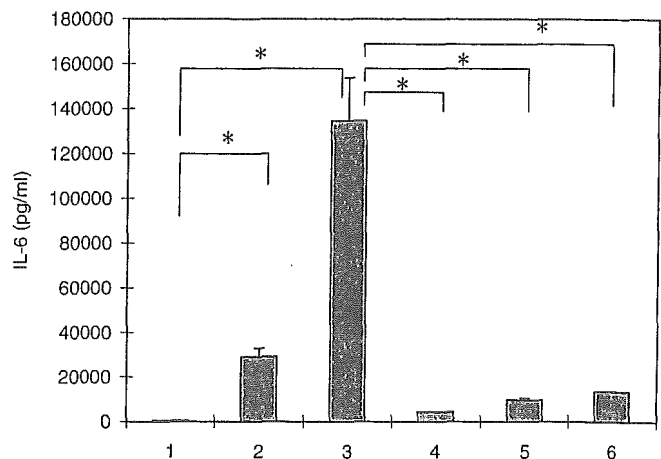
When RA-NLCs were cultured with CD14-negative cells, CD3-positive cells and CD19-positive cells, the levels of IL-6 in the culture supernatants were 10, 23, and 31 times higher ( $P < 0.01$ ), respectively, than that in the culture supernatants from RA-NLCs alone (Fig. 1). When RA-NLCs were cultured with CD14-positive cells, the levels of IL-6 were 200–660 times higher than the culture of RA-NLCs alone (Figs. 1 and 2) and 12 000–48 000 times higher than the culture of monocytes alone (data not shown). Similar results were obtained using the PBMC fractions from four

**Table 1.** Pseudoemperipoleosis of synoviocytes and lymphoma cell lines

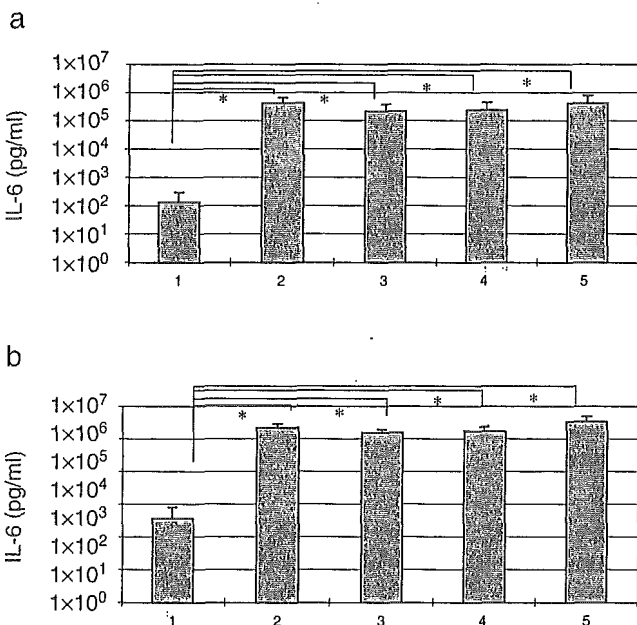
Origin of synoviocytes	Cell lines	Pseudoemperipoleosis (%) (mean $\pm$ SE)
RA ( $n = 12$ )	MOLT-17	76 $\pm$ 12*
OA ( $n = 5$ )	MOLT-17	5 $\pm$ 3
RA ( $n = 12$ )	MC/car	84 $\pm$ 19*
OA ( $n = 5$ )	MC/car	7 $\pm$ 4

$1 \times 10^4$  synoviocytes established from rheumatoid arthritis (RA) and osteoarthritis (OA) as described in the text were cocultured with  $4 \times 10^5$  human lymphoma cell line MOLT-17 or human B-cell line MC/car for 6 h. The number of the synoviocytes was counted having more than three lymphoma cells per one synoviocyte beneath themselves. The data were examined using analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni test

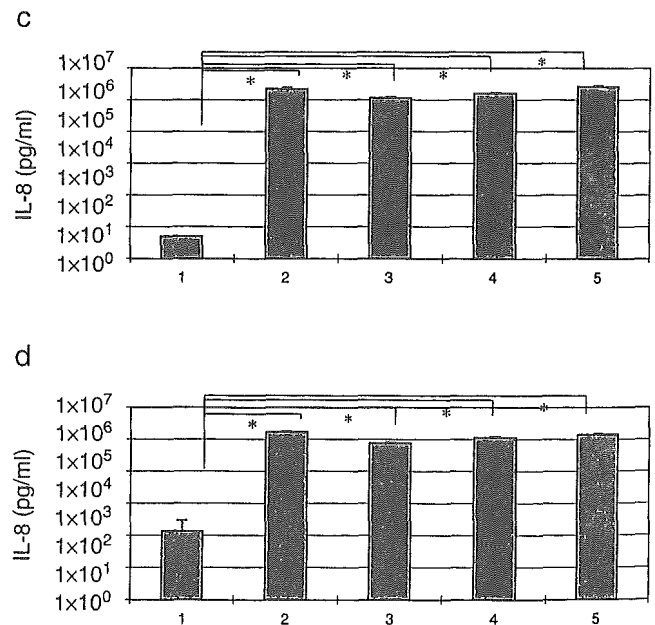
\*  $P < 0.05$  vs OA



**Fig. 1.** Interleukin-6 (IL-6) production by nurse-like cells derived from rheumatoid arthritis synovium (RA-NLCs) cocultured with peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) or fractionated cells. 1, production of IL-6 by RA-NLCs cultured alone; 2–6, production of IL-6 by RA-NLCs cocultured with PBMCs, CD14-positive cells, CD14-negative cells, CD3-positive cells, and CD19-positive cells, respectively. Levels of IL-6 are expressed as the mean  $\pm$  SE ( $n = 3$ ). RA275SY, one of the established cell lines, was used.  $1 \times 10^4$  RA-NLCs and  $2.5 \times 10^5$  cells isolated from PBMCs were cocultured or cultured alone in wells of a 24-well plate for 72 h. Levels of IL-6 were assessed by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit. Data were statistically analyzed by analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni test. \* $P < 0.01$



**Fig. 2a–d.** Production of interleukin-6 (IL-6) and interleukin-8 (IL-8) by nurse-like cells derived from rheumatoid arthritis synovium (RA-NLCs) cultured with monocytes (CD14-positive cells) from healthy donors. Levels of cytokines are expressed as the mean  $\pm$  SE ( $n = 3$ ). Data were statistically analyzed by analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni test. **a** IL-6 production by RA275SY cultured alone (1) or by RA275SY cultured with monocytes from four healthy donors (2–5).



**b** IL-6 production by RA615SY cultured alone (1) or RA615SY cultured with monocytes from four healthy donors (2–5). **c** IL-8 production by RA275SY cultured alone (1) or by RA275SY cultured with monocytes from four healthy donors (2–5). **d** IL-8 production by RA615SY cultured alone (1) or RA615SY cultured with monocytes from four healthy donors (2–5). \* $P < 0.01$

donors. The levels of IL-6 were significantly higher in the coculture of RA-NLCs and monocytes than in RA-NLC culture ( $P < 0.01$ , Fig. 2a,b) or in monocyte culture (data not shown).

The culture supernatant was also examined for IL-8. The levels of IL-8 were also much higher in the coculture of RA-NLCs and monocytes than in RA-NLC culture and in

monocyte culture, respectively (Fig. 2c,d, data not shown). Neither IL-1 $\beta$  nor TNF- $\alpha$  was detected in any of the culture supernatant fluids (data not shown).

In the next series of experiments, OA-FLSs were cultured with monocytes and the induction of IL-6 was examined. The levels of IL-6 were significantly higher in the coculture of OA-FLSs and monocytes than in OA-FLS culture ( $P < 0.05$ ) and in monocyte culture ( $P < 0.05$ ), respectively (Table 2). However, the levels were not as high as those in the coculture of RA-NLCs and monocytes (Table 2).

To elucidate the mechanism of cytokine production, RA-NLCs were cultured with monocytes in the presence of anti-human TNF- $\alpha$  mAb at 0.01, 0.1, or 1  $\mu\text{g/ml}$ . Induction of IL-6 was inhibited by the mAb at 0.1 and 1  $\mu\text{g/ml}$  mAb by 44% ( $P < 0.05$ ) and 58% ( $P < 0.01$ ), respectively. Interleukin-8 induction was also inhibited by the mAb at 0.01, 0.1 and 1  $\mu\text{g/ml}$  by 44% ( $P < 0.01$ ), 62% ( $P < 0.001$ ), and 74% ( $P < 0.001$ ), respectively. These results suggest that TNF- $\alpha$  plays a role in the induction of IL-6 and IL-8.

To examine whether direct contact is required for the interaction between RA-NLCs and monocytes, RA-NLCs and monocytes were cocultured with Millicells to inhibit contact. The level of IL-6 in the coculture of RA-NLCs and monocytes without direct contact was  $285 \pm 19$  pg/ml, while the level in the supernatant from RA-NLCs alone was  $255 \pm 21$  pg/ml ( $P = 1.000$ ) (Table 3). The level of IL-8 in the

**Table 2.** Comparison of interleukin-6 (IL-6) production levels

Synovial cells	Monocytes	IL-6	
		pg/ml	mean $\pm$ SE
None	Healthy donor 1	5	33 $\pm$ 35
		90	
		5	
RA-NLCs RA615SY	None	181	238 $\pm$ 36*
		280	
		253	
	Healthy donor 1	126900	220733 $\pm$ 73252
		203400	
		331900	
OA-FLSs OA2823	None	63	68 $\pm$ 3*
		70	
		71	
	Healthy donor 1	451	683 $\pm$ 142
		784	
		814	
OA4615	None	5	17 $\pm$ 15*
		42	
		5	
	Healthy donor 1	588	1219 $\pm$ 460
		1182	
		1888	
OA8491	None	5	9 $\pm$ 5*
		17	
		5	
	Healthy donor 1	179	259 $\pm$ 50
		284	
		314	

Nurse-like cells derived from RA synovium (RA-NLCs) and fibroblast-like cells derived from OA synovium (OA-FLSs) were cultured without monocytes and with monocytes from healthy donors. Data were statistically analyzed by unpaired *t*-test

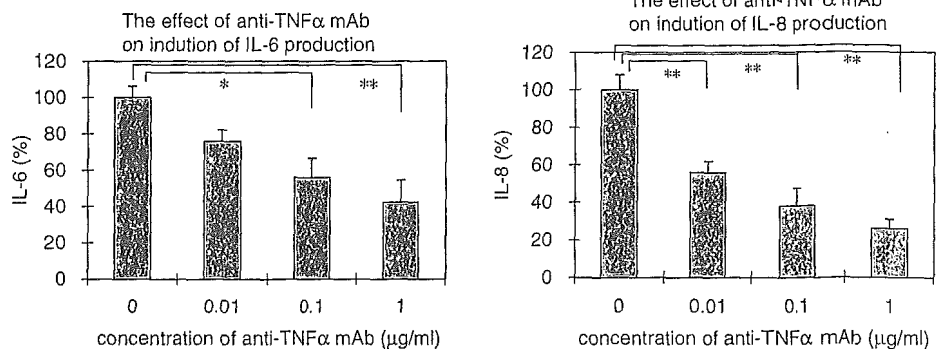
\*  $P < 0.05$  vs healthy donor 1

**Table 3.** Induction of interleukin-6 (IL-6) production by nurse-like cells derived from rheumatoid arthritis synovium (RA-NLCs) with or without direct interaction with monocytes

Synovial cells	Additional cells	IL-6, pg/ml (mean $\pm$ SE)
RA-NLCs	None	255 $\pm$ 21
RA-NLCs	Monocytes (separated)	285 $\pm$ 19*
RA-NLCs	Monocytes (mixed)	217000 $\pm$ 11800

$1 \times 10^4$  RA-NLCs were cultured with medium in a 24-well plate with or without  $4 \times 10^5$  monocytes on a Millicell culture plate insert or cocultured with the same number of monocytes without Millicell for 72h. The data were analyzed with analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni test

\*  $P < 0.05$  vs monocytes (mixed)



**Fig. 3.** Nurse-like cells derived from rheumatoid arthritis synovium RA615SY ( $1 \times 10^3$ ) and monocytes from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of a healthy donor ( $4 \times 10^4$ ) were cocultured for 72h in the presence of anti-human tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) monoclonal antibody (mAb) at 0, 0.01, 0.1, or 1  $\mu\text{g/ml}$ . Supernatant

fluids were analyzed for the levels of IL-6 and IL-8 by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit. The levels of IL-6 and IL-8 were compared with those in the supernatant of the coculture without mAb. Data were analyzed using ANOVA and Bonferroni test. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$