

100mM までの L-cysteine による阻害は顕著ではなかった。阻害は L-cysteine 及び L-cystine において同程度に見られた。これは赤痢アメーバのセリンアセチル転移酵素に特徴的であった。赤痢アメーバのセリンアセチル転移酵素は D-cysteine, N-acetyl-L-cysteine, DL-homocysteine, DL-homoserine によつては阻害を受けなかった。

4. 赤痢アメーバ粗抽出液からのシステイン合成酵素・セリンアセチル転移酵素の分離

赤痢アメーバ粗抽出液中のシステイン合成酵素及びセリンアセチル転移酵素の活性はそれぞれ $6.25, 4.76 \times 10^{-3}$ U/mg 蛋白であった。従つて、システイン合成酵素活性はセリンアセチル転移酵素活性の約 1000~1500 倍過剰に存在している(データ示さず)。更に、組み換え蛋白の混合実験によると、両酵素を活性比約 1200 で混合した際に最も高いシステイン合成活性が得られることが示された(データ示さず)。以上の結果は、*in vitro*、*in vivo* で両酵素が相互作用している可能性を示唆してい

る。細菌・植物においても両酵素は‘システイン合成酵素複合体’を作っていることが示されている。そこで赤痢アメーバの粗抽出液をゲル濾過クロマトグラフィーにより分離し、両酵素活性を測定した(図3)。両酵素活性のピークは分離し、分子量マーカーを用いた推定では、システイン合成酵素が 59.1 ± 4.8 kDa に、セリンアセチル転移酵素が 71.0 ± 3.0 kDa に溶出された。この結果は両酵素はホモダイマーとして存在することを示唆している。しかしながら、細菌及び植物の例と異なり、ホモマルチマー或いはヘテロマーの存在は確認されなかった。

5. セリンアセチル転移酵素遺伝子の構造の解析

蛋白コード領域を切断しない制限酵素でゲノム DNA を切断し、サザンブロットを行った場合、それぞれ一本のバンドのみが認識された。この結果から、セリンアセチル転移酵素遺伝子はシングルコピー遺伝子として存在することが示唆された。

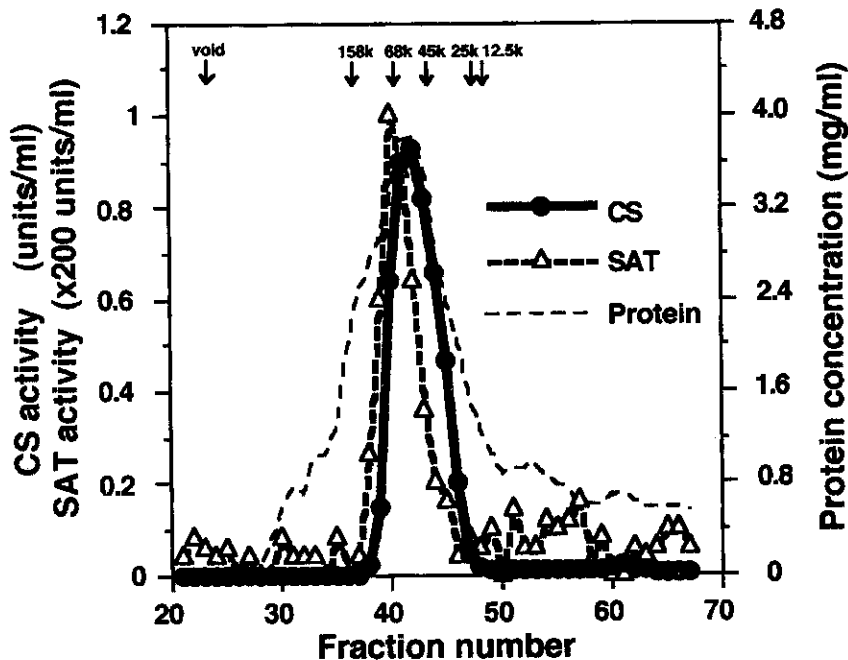


図3 ゲル濾過TOYOPEAL HW 55 Sを用いた赤痢アメーバ粗抽出液からのシステイン合成酵素及びセリンアセチル転移酵素の溶出

蛋白スタンダードは以下の通りアルドラーゼ(158kDa), アルブミン(68kDa), オバルミン(45kDa), キモトリプシン(25kDa), チトクロームC (12.5kDa)。黒丸及び太線はシステイン合成酵素活性を示す。白三角及び太破線はセリンアセチル転移酵素活性を示す。細破線は蛋白濃度を示す。

考 察

L-cysteineはグルタチオンをもたない赤痢アメーバにおける最高濃度チオール化合物である。その生物学的重要性は細胞増殖、接着、運動などに関して示されている。我々はシステイン合成経路における2つの主要酵素をクローニングし、解析してきた¹⁻³⁾。ひとつは昨年度の報告書でも詳述したシステイン合成酵素であり、もう一つは硫黄同化の初段を担うATPスルフィラーゼである。更に今回システイン生合成の調節酵素であるセリンアセチル転移酵素を同定する事により、今後更に本経路の生理的意義が明らかになるであろう。

赤痢アメーバのセリンアセチル転移酵素遺伝子が欠損大腸菌を用いたレスキューにより得られたことより、その機能は細菌と原虫とで保存されていると思われる。しかしながら、本経路はヒトをはじめとした哺乳類には存在せず、赤痢アメーバ症の診断・治療法開発のための有望な標的と考えられる。

赤痢アメーバのセリンアセチル転移酵素は以下に述べるいくつかの点において特徴的である。アミノ酸一次配列において、(1)プラスミド上にコードされた藍藻類のセリンアセチル転移酵素と高い相同性を示す。(2)赤痢アメーバに特異的な挿入部位を有する。生化学的な解析により、(3)酸化型L-cysteine及び還元型L-cystine両者により阻害を受ける。即ち、総cysteine量により調節される。(4)阻害形式がL-serineに競合的である。(5)他の細菌及び植物と異なり、システイン合成酵素と複合体を形成しない。これらの赤痢アメーバに特異的な性質は本経路を標的分子として開発する際に重要と考えられる。

尚、本報告書では記述しなかったが、非病原性*E. dispar*からも同様の手法によりセリンアセチル転移酵素遺伝子を獲得し、全塩基配列を決定している。これらのデータをもとに更に病原性及び非病原性アメーバの鑑別診断が可能である。

結 論

赤痢アメーバのシステイン生合成経路は有望な抗アメーバ剤開発の標的であることが明らかと

なった。特に、本年度解析したセリンアセチル転移酵素は本経路の調節機構を担う中心的酵素であり、そのアメーバ特異的な生化学的特質は抗アメーバ剤開発に利用し得るものと考えられる。

参考文献

- 1) Nozaki, T., Asai, T., Kobayashi, S., Ikegami, F., Noji, M., Saito, K., and Takeuchi, T. Molecular cloning and characterization of the genes encoding two isoforms of cysteine synthase in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 1998 97: 33-44.
- 2) Nozaki, T., Arase, T., Shigeta, Y., Asai, T., Leusteck, T., and Takeuchi, T. Cloning and bacterial expression of adenosine-5'-triphosphate sulfurylase from an enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Biochim Biophys Acta* 1998 1429: 284-291.
- 3) Nozaki, T. and Takuchi, T. Analysis of cysteine biosynthetic pathway in *Entamoeba histolytica*: Involvement of cysteine in the antioxidative defense mechanism. *The Proceedings of the Ixth International Congress of Parasitology 1998 Monduzzi Editore, Bologna, Italy.*, in press.



急性トキソプラズマ症の遺伝子診断法の改良と新種の寄生虫 *Neospora caninum* との鑑別

三浦 恵¹⁾、浅井 隆志²⁾、竹内 勤²⁾

¹⁾横浜市立大学医学部 ラジオアイソトープ研究センター

²⁾慶應義塾大学医学部 熱帯医学・寄生虫学教室

研究要旨

エイズに合併する急性トキソプラズマ症の遺伝子診断法の改良を目的に、実際のエイズ患者からのサンプルに適応できる方法を以下の二項目について検討した。1) トキソプラズマの急増虫体に特異的にしかも大量に存在する酵素(ヌクレオシド三リン酸ヒドロラーゼ、NTPase)の mRNA を RT-PCR 法で検出する診断法の改良を行った。2) トキソプラズマのリボゾーム DNA の Nested PCR による検出とその PCR 産物の制限酵素切断部位の確認によって、トキソプラズマの近縁種の寄生虫 *Neospora caninum* との鑑別を行った。その結果、RT-PCR 法では設計したプライマーの組み合わせにより各種臓器からの急増虫体の検出が可能であった。したがって、この方法はエイズ患者における急性トキソプラズマ症の早期診断に有用であると考えられる。また Nested PCR では成人 T-Cell 白血病 (ATL) に合併した急性トキソプラズマ症が疑われた患者の各種臓器よりリボゾーム DNA が検出され、制限酵素 (*Sac*FI, *Dde*I) の切断部位の存在により、トキソプラズマ症であることが確定した。この方法は今後出現が予想されるネオスポラ症とトキソプラズマ症の鑑別に有用と思われる。

分担研究者：竹内 勤

研究協力者：三浦 恵、浅井隆志

Improvement of diagnostic polymerase chain reaction for acute toxoplasmosis and discrimination of *Toxoplasma gondii* from newly recognized protozoan parasite, *Neospora caninum*.

Satoshi Miura¹⁾, Takashi Asai²⁾, and Tsutomu Takeuchi²⁾

¹⁾Radioisotope Research Center, Yokohama City University, ²⁾Department of Tropical Medicine and parasitology, School of Medicine, Keio University

目 的

急性トキソプラズマ症の診断は、患者の各種サンプルより直接原虫を検出することが最も確実な検査法である。しかし顕微鏡下での虫体の検出ははなはだ困難であり、通常は陰性である。これに代わる方法としてはその迅速性から遺伝子診断法が最適である。しかし通常の遺伝子はシングルコピーであることが多く、検出感度の点で問題がある。我々は先の研究で急性感染症を起こすトキソプラズマの急増虫体に特異的にしかも大量に存在する酵素(ヌクレオシド三リン酸ヒドロラーゼ、NTPase)(1)を見出しているが、このNTPaseのmRNAを検出する方法はNTPaseのDNA検出系よりも10倍以上感度がよい。今回の研究では現在のNTPaseのmRNA検出系をさらに感度が良く特異性の高いものへ改良し、実際の患者各種サンプルに対応できるようにすることを第一の目的とする。

第二の目的として、最近トキソプラズマの近縁種であるネオスポラ(*Neospora caninum*)の存在が報告されているが、トキソプラズマとネオスポラの鑑別可能な系を確立する。そのために、両原虫のリボゾームDNA(rDNA)を共通に増幅するPCR系を構築し、制限酵素切断部位の違いで両原虫の鑑別を行う。

方 法

1. RT-PCRによるNTPaseのmRNAの検出

a. トキソプラズマ感染組織サンプル

NTPaseのmRNAを検出する広範な検討を行うにあたり、実際のヒトの組織サンプルは貴重であり量も限られるので、今回はマウスにトキソプラズマを感染させ、その肝臓および脾臓をサンプルとして用いた。トキソプラズマは強毒株であるRHおよび弱毒株であるME49, Beverleyを使用した。RH株はマウスの腹腔内で三日おきに継代した急増虫体を、5週齢のICRマウス一匹あたり1000万個体を腹腔内に感染させ三日後に臓器を摘出し、これを用いた。ME49およびBeverley株は慢性感染したマウスの脳より緩増虫体の入ったシストを取り出し、5週齢のICRマウス一匹あたり5個

を腹腔内に感染させ二週後に臓器を摘出し、これを用いた。

b. 検体からのRNA抽出

細胞の可溶化液(4M Guanidium thiocyanate, 25mM Na-Citrate, 0.5% Sarcosyl, 0.1M 2-Mercaptoethanol)を細胞あるいは組織の10倍量加えてホモジナイズした。1/10量のNa-Acetate、等量のフェノール、1/5量のクロロホルム/イソアミル(49:1)を加えて、攪拌後15分間氷冷した。これを9250gで15分間4℃で遠心し、上清に等量のイソプロパノールを加えて-70℃で1時間RNAを沈殿させた。次に9250gで20分間4℃で遠心し、沈殿したRNAを真空乾燥後再度細胞の可溶化液をもとの組織と等量加えた。これに等量のイソプロパノールを加えて-70℃で一晩RNAを沈殿させた。沈殿したRNAを前述と同様に遠心で集め、75%エタノールで洗浄後乾燥し、RT-PCR反応まで-20℃で保存した。

c. RT-PCR反応

サンプルとして1μ以下のRNAを用い、10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.3, 5 mM MgCl₂, 1mM dNTP, 0.5U RNAase inhibitor, 0.25U RTase, 2.5μM Random primers になるようにそれぞれの試薬を加えて全量を40μlとした。この反応液をサーマルサイクラーで30℃ 10分、42℃ 30分、99℃ 5分、5℃ 5分の順で保温した。RNAより変換したDNAを以下のPCR反応で検出した。増幅するプライマーとしてセンス側の配列5'-CCTTCTCCCAGAAC GTTATC-3' および5'-AGCATTCTCGTCGCTCCC-3'、アンチセンス側の配列5'-CTTCGTTGGATCA ATCGAGT-3' および5'-CTGCCGCCATGT GCCTAA-3'を用い、熱変性94℃1分(1回目は9分)、アニーリング60℃1分、伸長反応72℃5分(最終回は10分)、反応サイクルは30回行った。PCRで合成された遺伝子のフラグメントは1%のアガロースゲルで電気泳動を行い、一般的な方法で検出した。

2. リボゾームDNAによるトキソプラズマとネオスポラの鑑別

a. 検体からのDNA抽出

トキソプラズマの急増虫体を含む生理食塩液あるいは急性トキソプラズマ症患者の各種臓器にTritonX-100を加え、90℃で10分間加熱した。つぎ

に可溶化液を加え(最終濃度、0.5mg/ml Proteinase K, 10mM Tris-HCl pH8.0, 10mM EDTA, 0.5% sodium N-lauroyl sarcosinate)60℃で2時間振盪した。続いて、一般に行われている方法でフェノール抽出、エタノール沈殿を行いDNAを抽出し、PCR反応を行うまで-20℃で保存した。

b. PCR 反応(Nested PCR)

増幅するプライマーとしてセンス側の1回目の配列5'-CCATGCATGT CTAAGTATAAGC-3'、アンチセンス側の1回目の配列5'-GTTACCCGT CACTGCCAC-3'を用い、熱変性94℃30秒(1回目は5分)、アニーリング64℃90秒、伸長反応72℃2分(最終回は7分)、反応サイクルは40回行った。二回目の増幅するプライマーとしてセンス側の配列5'-CTAAGTATA AGCTTTTATACGGC-3'、アンチセンス側の配列5'-TGCCACGGTAGTC CAATAC-3'を用いた。PCRで合成された遺伝子のフラグメントは3%のアガロースゲルで電気泳動を行い、一般的な方法で検出した。

C. 制限酵素切断部位によるトキソプラズマとネオスポラの鑑別

PCR産物であるDNA断片をDNA精製キット(Gene Clean, Stratagene)を用いて精製後、*ScrFI*、*DdeI*を作用させ、3%のアガロースゲルで電気泳動を行い、一般的な方法で検出した。

結果

1. RT-PCRによるNTPaseのmRNAの検出

設計したプライマーが表1にまとめてある。F1R1の組み合わせでは342bp, F2R2では369bp, FIR2では796bpのDNAが理論的にはそれぞれ増幅される。実際に増幅されたDNAが図1に示されているが、DNAマーカーとの比較からほぼ理論値

と同一であることがわかる。トキソプラズマRH株の急増虫体およびME49, Beverley株の緩増虫体(シスト型)を感染させたマウスの肝臓、脾臓からのmRNAの検出結果が表2に示されている。RH株の感染した肝臓と脾臓からはどのプライマーの組み合わせでも、1回のPCRでmRNAが検出された。一方弱毒株のME49, Beverley株の肝臓、脾臓からは1回のPCRではmRNAは検出されず、二回目のPCRでF2R2のプライマーの組み合わせでmRNAは検出された。F1R1の組み合わせではまったくmRNAは検出されなかった。またFIR2の組み合わせではME49株の脾臓のみから二回目のPCRでmRNAが検出された。以上の結果より、F2R2の組み合わせが最適であることがわかった。

2. rDNAによるトキソプラズマとネオスポラの鑑別

トキソプラズマ/ネオスポラの18SのrDNAと増幅するDNAの位置、使用するプライマーの配列およびトキソプラズマのrDNAに存在する制限酵素切断部位が図2に示してある。一回目のPCRでは311bp, 二回目のPCRでは290bpのDNAが増幅する。この系を用いて急性トキソプラズマ症の合併が疑われたATLの患者各種臓器のDNAサンプルを鋳型にして増幅されたrDNAが図3に示されている。この患者の場合一回目PCRで全ての臓器より標的DNAの増幅が見られた。300bpのマーカーの少し上に増幅されたDNAが泳動されることから一回目のPCRであることがわかる。このDNAを精製後、制限酵素(*ScrFI*と*DdeI*)を作用させた結果が図4である。両酵素ともrDNAを切断することから、この患者はトキソプラズマ症であることがわかる。

表1 RT-PCRのプライマー

プライマー名	シーケンス	*ORF上の位置
F1 (センス)	5'-CCTTCTCCCAGAACGTTATC-3'	924~943
R1 (アンチセンス)	5'-CTTCGTTGGATCAATCGAGT-3'	1247~1266
F2 (センス)	5'-AGCATTCTCGTCGCTCCC-3'	1351~1370
R2 (アンチセンス)	5'-CTGCCGCCATGTGCCTAA-3'	1701~1720

*ORF=Open Reading Frame

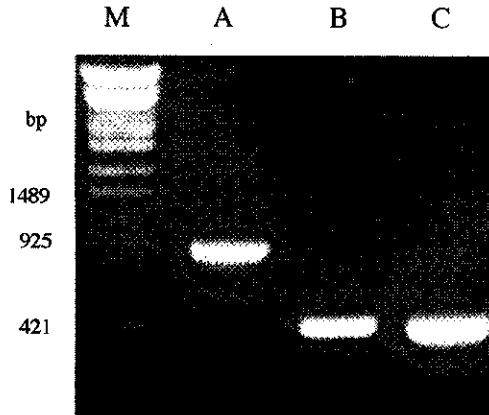
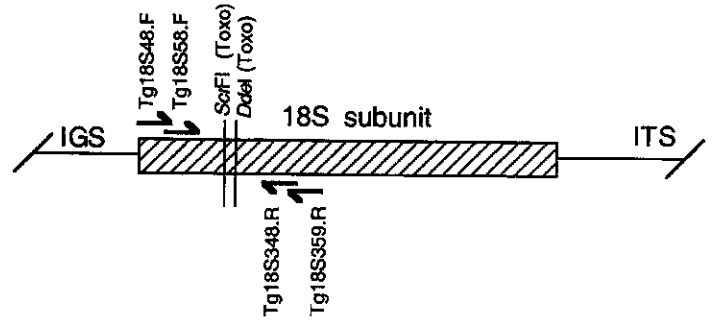


図1 RT-PCRにより増幅されたプライマーの組み合わせごとのNTPase遺伝子断片のアガロースゲル電気泳動像(M)マーカー、(A)F1R2、(B)F1R1、(C)F2R2



PRIMER SEQUENCES

Tg18S48.F CCA TGC ATG TCT AAG TAT AAG C
 Tg18S58.F CTA AGT ATA AGC TTT TAT ACG GC
 Tg18S348.R TGC CAC GGT AGT CCA ATA C
 Tg18S359.R GTT ACC CGT CAC TGC CAC

図2 トキソプラズマ/ネオスポラの18SリボゾームDNAと増幅するプライマーの塩基配列

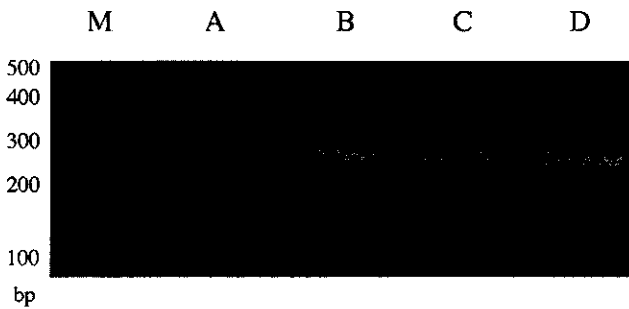
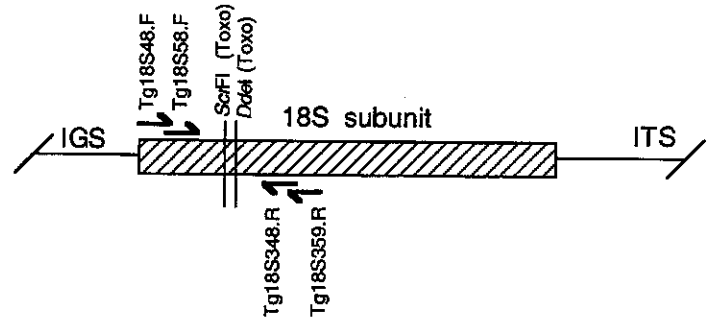


図3 PCRで増幅したrDNAのアガロースゲル電気泳動像(ATL患者検体からの検出)(M)マーカー、(A)肝臓、(B)肺、(C)脾臓(D)骨髄



PRIMER SEQUENCES

Tg18S48.F CCA TGC ATG TCT AAG TAT AAG C
 Tg18S58.F CTA AGT ATA AGC TTT TAT ACG GC
 Tg18S348.R TGC CAC GGT AGT CCA ATA C
 Tg18S359.R GTT ACC CGT CAC TGC CAC

図4 PCRで増幅したrDNAのアガロースゲル電気泳動像(制限酵素切断による種の鑑別)(M)マーカー

表2 RT-PCRによるNTPaseのmRNAの検出

Toxoplasma 株	組織	プライマー	PCR結果	
			一回目	二回目
RH	肝臓	F1-R1	+	+
		F2-R2	+	+
		F1-R2	+	+
	脾臓	F1-R1	+	+
		F2-R2	+	+
		F1-R2	+	+
ME49	肝臓	F1-R1	-	-
		F2-R2	-	+
		F1-R2	-	-
	脾臓	F1-R1	-	-
		F2-R2	-	+
		F1-R2	-	+
Beverley	肝臓	F1-R1	-	-
		F2-R2	-	+
		F1-R2	-	-
	脾臓	F1-R1	-	-
		F2-R2	-	+
		F1-R2	-	-

考 察

日和見感染原虫の遺伝子診断は他の病原体に比べて多くの問題を抱えている。その最たる問題は、結果が陽性と出てもその原虫が病気の主原因であるか判断に苦慮することである。トキソプラズマ感染もその例にもれず、先進国でも不顕性感染した人口の何割かの既感染者が存在する。すなわち DNA の検出だけでは急性と慢性の区別ができない。急性トキソプラズマ症を証明するには、病気を引き起こす急増虫体の存在を確認する必要がある。またトキソプラズマ症の遺伝子診断は他の病原体に比べて検出感度について不利な点がある。それはトキソプラズマのほとんどの遺伝子はシングルコピーであり、複数コピーの遺伝子はごく一部しか知られていない。NTPaseにはアイソザイムが存在するので少なくとも2コピーの遺伝子が存在する²⁾が、上述の問題の解決にはならない。しかしNTPaseはトキソプラズマの急増虫体に大量に存在することからそのmRNA量が多い³⁾。さらにNTPaseは慢性感染をしている緩増虫体では発現されておらず(未発表)、急増虫体にのみそのmRNAが存在する。したがって、NTPaseのmRNA検出は即急性トキソプラズマ症の確定診断となるものと考えられる。今回プライマーの設計を再度行いより感度が良く、実際患者サンプルに最も適した系の検討を試みた。表1に示されたプライマーの設計がORFの後半に限局しているのは、この部分にアイソザイムを鑑別する制限酵素切断部位(NheI, BamHI)が存在するからである²⁾。これは陽性の結果を得たとき、トキソプラズマの病原性の予測が可能で、予後の予測にも役立つと考えられる。

ネオスポラは米国農務省のJ.P. Dubey博士が1988年に最初に報告した⁴⁾原虫で、形態的にはトキソプラズマと見分けがつかない。しかし、抗原性がかなり異なること、遺伝子のコドンバイアスが異なることから、明らかに別種の原虫である。家畜をはじめ動物ではトキソプラズマと同様な病原性が認められるが、ヒトへの感染はいまのところ確認されていない。免疫不全患者ではネオスポラの合併が今後起こり得ることが考えられる。事実、トキソプラズマ感染が疑われたが確定診断に

至らなかったケースが過去に幾つかあり、その鑑別法の確立が早急に必要と思われる。今回用いたrDNA検出系はトキソプラズマのDNAを標的にした検出系では最も感度が良いものの一つである。それはこの遺伝子が虫体あたり100コピーほど存在するためである。この点、上述のmRNAの検出と感度的にはさほど違いはなく、トキソプラズマのDNA検出の欠点をクリアーしている。最近我々は、ネオスポラにもトキソプラズマのNTPase-Iに類似した酵素を見出し、遺伝子の全塩基配列を決定した⁵⁾。今後はこのmRNAを利用した診断法も考えられる。

結 論

急性トキソプラズマ症の新しい遺伝子診断法として、トキソプラズマに特異的に存在するNTPaseのmRNA検出法を実際のサンプルに適應できる系に改良した。またrDNAを用いて、トキソプラズマとネオスポラの鑑別を行う系を開発した。

参考文献

- 1) T. Asai, W.J. O'Sullivan, M. Tatibana A potent nucleoside triphosphate hydrolase from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii* J. Biol. Chem. 258, 6816-6822, 1983
- 2) T. Asai, S. Miura, L. D. Sibley, H. Okabayashi, T. Takeuchi Biochemical and molecular characterization of nucleoside triphosphate hydrolase isozymes from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii* J. Biol. Chem., 270, 11391-11397, 1995
- 3) A.M. Johnson, S. Illana, P.J. McDonald, T. Asai Cloning, expression, and nucleotide sequence of the gene fragment encoding an antigenic portion of the nucleoside triphosphate hydrolase of *Toxoplasma gondii* Gene, 85, 215-220, 1989
- 4) J.P. Dubey, A.L. Hattel, D.S. Lindsay, M. J. Topper Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of the causative agent and experimental transmission. J. American Veterinary Medical Association 193, 1259-1263, 1988
- 5) T. Asai, D. K. Howe, K. Nakajima, T. Nozaki, T. Takeuchi, L. D. Sibley *Neospora caninum*: Tachyzoites express a potent type-I nucleoside triphosphate hydrolase, but lack nucleoside diphosphate hydrolase activity Exptl. Parasitol. 90, 277-285, 1998



大腸菌に発現させた遺伝子組み換え体抗原、ヌクレオシド三リン酸ヒドロラーゼアイソザイムおよびSurface Antigen 1を用いた急性トキソプラズマ症の血清診断法の評価

浅井 隆志¹⁾、山下 直哉²⁾、三浦 恵³⁾、竹内 勤¹⁾

¹⁾慶應義塾大学医学部 熱帯医学・寄生虫学教室

²⁾慶應義塾大学医学部 小児科学教室

³⁾横浜市立大学医学部 ラジオアイソトープ研究センター

研究要旨

急性トキソプラズマ症を起こすトキソプラズマの急増虫体に特異的にしかも大量に存在する酵素(ヌクレオシド三リン酸ヒドロラーゼ、NTPase)の二種類のアイソザイム(NTPase-I, NTPase-II)とSurface Antigen 1-グルタチオンイオウ転移酵素の融合蛋白(GST-SAG1)を遺伝子工学手法を用いて大腸菌に大量発現させた。NTPase-IIはその発現させた半分量を活性のある型に変換した。そしてこれらの抗原を用いたELISA法の吸光度と急性トキソプラズマ症の現在最も信頼されている血清診断法である色素試験抗体価と比較した。その結果NTPaseのアイソザイムを用いたELISA法の吸光度と色素試験抗体価は非常に良く相関し、このELISA法(NTPase-ELISA)は急性トキソプラズマ症の血清診断に有用であることが確認された。また活性のあるNTPase-I(rNTPase-I)と尿素で変性させたまま精製したNTPase-I(dNTPase-I)およびNTPase-II(dNTPase-II)を用いたELISA法の吸光度はそれぞれ相関がよく抗原別の優位性は認められなかった。GST-SAG1は患者血清とほとんど反応しなかった。

分担研究者：竹内 勤

研究協力者：浅井隆志、山下直哉、三浦 恵

Evaluation of serodiagnosis of acute toxoplasmosis by using the recombinant antigens, nucleoside triphosphate hydrolase isoforms and surface antigen 1, expressed in *Escherichia coli*

Takashi Asai¹⁾, Naoya Yamashita²⁾, Satoshi Miura³⁾ and Tsutomu Takeuchi¹⁾

¹⁾Department of Tropical Medicine and parasitology, ²⁾Department of pediatrics, School of Medicine, Keio University,

³⁾Radioisotope Research Center, Yokohama City University

目 的

エイズに高率に合併する急性トキソプラズマ症の血清診断法は現在でもなお50年ほど前にSabinとFeldmanによって開発された色素試験が最も信頼できる。しかしこの検査法は生きたトキソプラズマの急増虫体を必要とするため、一般の検査室では実施できない。そこでこの色素試験にかわる簡便で信頼性の高いどの施設でも実施可能な血清学的診断法の開発が望まれている。我々は先に急増虫体に特異的にしかも大量に存在する酵素(ヌクレオシド三リン酸ヒドロラーゼ、NTPase)を見出しているが、本研究ではこのNTPaseを大腸菌に大量発現させ、これを抗原としたELISA法の吸光度と色素試験抗体価を比較する。同時に存在するアイソザイムの種類ごとの抗原としての評価とNativeな型への変換(refold)の必要性を調べる。また急増虫体の細胞膜に大量に存在するSAG1との抗原としての比較を行い、NTPaseを用いた診断法の有用性について評価を行う。

方 法

1. 遺伝子組み換え抗原の作製

NTPaseには二種類のアイソザイムが存在するが、コードする部分である遺伝子(Open Reading Frame)は共通のプライマー(forward oligo 5'-TACCATATGACAGACTCATCGTCACTCCG-3'; reverse oligo 5'-TCGCTCGAGTCA CAGATTGTGAG AATATCC-3')でPCR法により増幅可能である。それぞれのアイソザイムは対応する遺伝子を組み込まれたpBluescript-II(SK⁺)を鋳型にして遺伝子を増幅し、発現ベクターであるpET22(b)⁺のNdeI/XhoIサイトに組み込み、大腸菌BL21に導入した。詳細な手技については記載の方法²⁾による。SAG1はアミノ酸残基49から323をトキソプラズマのRH株のDNAを鋳型にしてPCR法で増幅した(forward oligo 5'-TACGAATTCGAT CCCCCTCTTGTTGCC-3'; reverse oligo 5'-TCGGAATTCTCACATGGCA AAAATG GAAAC-3')遺伝子をpGEX-5X-1のEcoRIサイトに組み込み、大腸菌DH10Bに導入することで得た。詳細な発現手技については記載の方法²⁾による。

2. 遺伝子組み換え体抗原の精製

発現させたNTPase-I, NTPase-IIおよびGST-SAG1はいんインクルージョンボダイで合成されるため、尿素で可溶化した後、尿素の存在下で精製した。NTPase-IとNTPase-IIのインクルージョンボダイは8M尿素で可溶化した後、6M尿素の存在下でDEAE-Toyopeal 650S, Toyopeal HW55Sを用いて精製した。GST-SAG1のインクルージョンボダイは8M尿素(pH12)で可溶化し、8M尿素(pH12)の存在下でToyopeal HW55Sを用いて精製した。詳細な精製手技については記載の方法³⁾による。

3. NTPase-Iの活性型への変換(Refolding)と精製

NTPase-Iのインクルージョンボダイを6Mのグアニジン塩酸で溶解した後、50 mM Tris-HCl, pH 7.5で6倍にうすめ一晚放置した。これを50 mM Tris-HCl, pH 7.5で透析することで活性をrefoldした。活性のあるNTPase-IはDEAE-Toyopeal 650S, Toyopeal HW55Sを用いて精製した。詳細な精製手技については記載の方法³⁾による。

3. 酵素抗体法(ELISA法)

精製した抗原はそれぞれをポリスチレンマイクロタイタープレートに感作し、これにヒト血清を反応させることで抗原と抗体を結合させた。結合した抗体は次にアルカリホスファターゼ結合抗ヒト抗体(AP conjugated anti-human IgG)と反応後、2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)を基質として発色させた。各ウエルの反応液の405 nmにおける吸光度をマイクロタイタープレートリーダーを用いて測定した。詳細な手技については記載の方法³⁾による。

5. 色素試験(Dye-Test)

色素試験は生きたトキソプラズマRH株の急増虫体をアルカリメチレンブルーで染色することで行った。詳細な手技については記載の方法⁴⁾による。

結果

精製した各種抗原のSDS-電気泳動像が図1である。NTPaseはIおよびII型のアイソザイムとも67kDa付近に、GST-SAG1は55kDa付近にそれぞれ泳動され、ほぼ単一であることがわかる。これらの抗原を用いてELISA法を施行し、色素試験抗体価との相関を調べたものが図2から図5である。トキソプラズマに対する抗体を保有しない健康人(30人)は各種抗原に対して反応せず、全ての検体の示す吸光度は低値であった。そこでこれらの検体の示した吸光度の平均値に平均偏差値の3倍の値を加えた数値以下を陰性、それ以上を陽性と判断した。この基準での擬陽性者と判断される検体はひとつもなかった(図2～図5)。活性をrefoldしたNTPase-I(rNTPase-I)を抗原としたELISAの吸光度と色素試験抗体価を比較したScatter plotが図2である。rNTPase-Iを抗原としたときの全体の陽性率は79%(55/70)で、急性症の判断基準である色素試験1024倍以上の検体の陽性率は93%(13/14)であった。変性剤の存在下で精製したNTPase-I(dNTPase-I)を抗原としたELISAの吸光度と色素試験抗体価を比較したScatter plotが図3である。dNTPase-Iを抗原としたときの全体の陽性率は64%(45/70)で、色素試験1024倍以上の検体の陽性

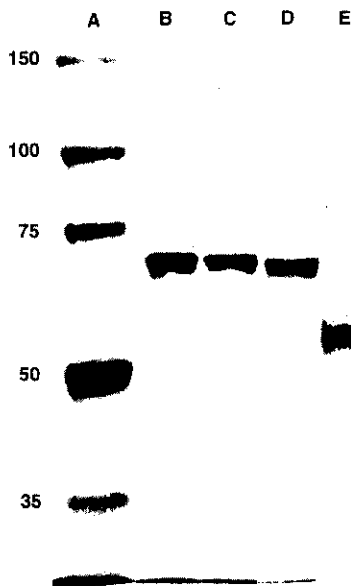


図1 精製された遺伝子組み換え体抗原のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動像 A, 分子量マーカー(kDa); B, 酵素活性をリホールドしたNTPase-I(rNTPase-I); C, 6 M 尿素存在下で精製した変性NTPase-I(dNTPase-I); D, 6 M 尿素存在下で精製した変性NTPase-II(dNTPase-II); E, GST-SAG1の融合蛋白質。

率は93%(13/14)であった。変性剤の存在下で精製したNTPase-II(dNTPase-II)を抗原としたELISAの吸光度と色素試験抗体価を比較したScatter plotが図4である。dNTPase-IIを抗原としたとき全体の陽性率は77%(54/70)で、色素試験1024倍以上の検体の陽性率は93%(13/14)であった。三種類の抗原を使ったELISA吸光度は色素試験抗体価の上昇に応じて高値を示し、両方が非常に良く相関することがわかる(図2～図4)。ただし色素試験抗体価が1024と高いにもかかわらずどの抗原とも反応しない血清が一検体であるが存在した。一方GST-SAG1にはほとんどの色素試験陽性血清が反応せず、全体の陽性率はわずか6%(4/70)であった(図5)。rNTPase-IとdNTPase-Iをそれぞれ抗原とした時の吸光度を比較したものが図6である。両吸光度の関係は $X=Y$ の相関を示し、活性をrefoldした抗原の優位性は認められなかった。dNTPase-IとdNTPase-IIをそれぞれ抗原とした時の吸光度を比較したものが図7である。両吸光度の関係は $X=Y$ のほぼ相関を示し、抗原別の優位性は認められなかった。

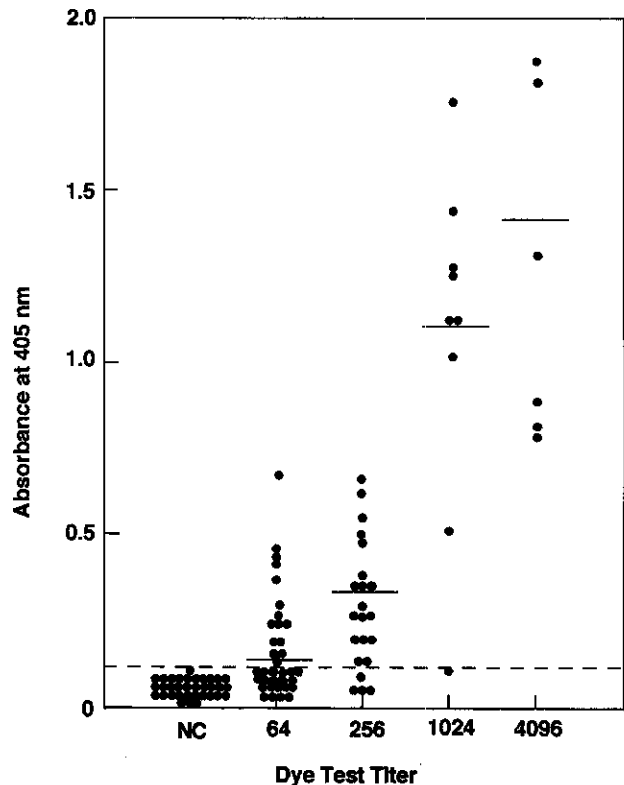


図2 遺伝子組み換え体(rNTPase-I)を抗原としたNTPase-ELISAと色素試験の抗体価を比較したScatter plot。波線は色素試験抗体価陰性血清のNTPase-ELISA吸光度の平均値に平均偏差値の三倍の値を加えた時の吸光度($m + 3SD$)。実線は同一色素試験抗体価検体におけるNTPase-ELISA吸光度の平均値。NC, 色素試験抗体価陰性検体。

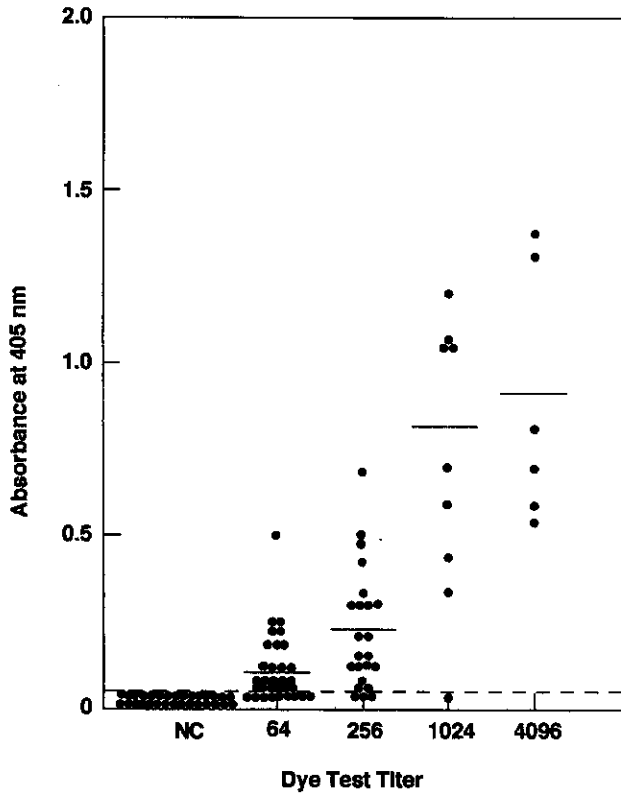


図3 遺伝子組み換え体(dNTPase-I)を抗原とした NTPase-ELISA と色素試験の抗体価を比較した Scatter plot。波線は色素試験抗体価陰性血清の NTPase-ELISA 吸光度の平均値に平均偏差値の三倍の値を加えた時の吸光度($m + 3SD$)。実線は同一色素試験抗体価検体における NTPase-ELISA 吸光度の平均値。NC, 色素試験抗体価陰性検体。

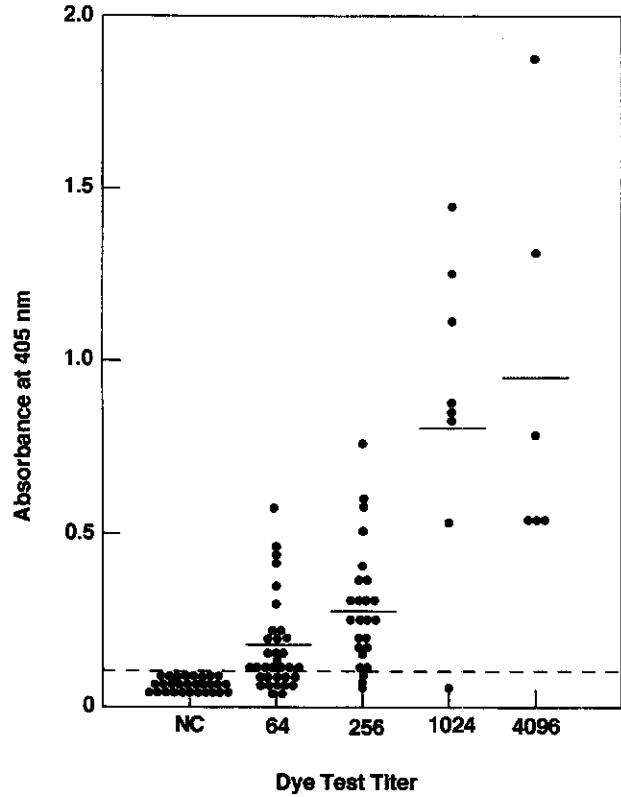


図4 遺伝子組み換え体(dNTPase-II)を抗原とした NTPase-ELISA と色素試験の抗体価を比較した Scatter plot。波線は色素試験抗体価陰性血清の NTPase-ELISA 吸光度の平均値に平均偏差値の三倍の値を加えた時の吸光度($m + 3SD$)。実線は同一色素試験抗体価検体における NTPase-ELISA 吸光度の平均値。NC, 色素試験抗体価陰性検体。

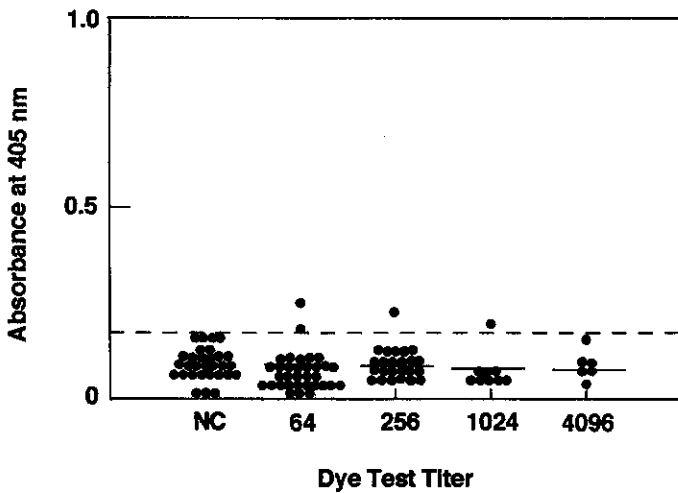


図5 遺伝子組み換え体(GST-SAG1)を抗原とした GST-SAG1-ELISA と色素試験の抗体価を比較した Scatter plot。波線は色素試験抗体価陰性血清の GST-SAG1-ELISA 吸光度の平均値に平均偏差値の三倍の値を加えた時の吸光度($m + 3SD$)。実線は同一色素試験抗体価検体における GST-SAG1-ELISA 吸光度の平均値。NC, 色素試験抗体価陰性検体。

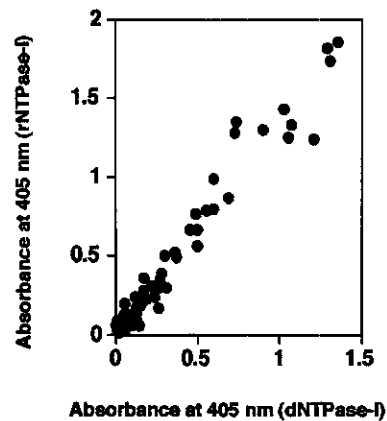


図6 rNTPase-I と dNTPase-I を抗原としたときの両 ELISA 吸光度を比較した Scatter plot。

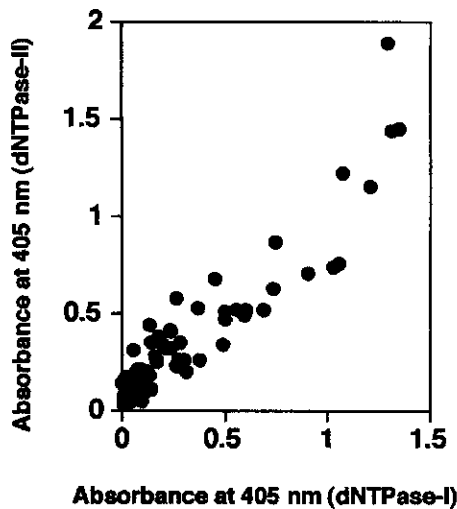


図7 dNTPase-IとdNTPase-IIを抗原としたときの両ELISA吸光度を比較したScatter plot。

考 察

色素試験抗体価と一般に広く行われている各種凝集反応抗体価の相関が悪いのは、色素試験が低抗体価にもかかわらず各種凝集反応の抗体価が高いせいである。その原因として各種凝集反応に使用される抗原が急増虫体の粗抽出物であることが考えられる。急増虫体の粗抽出物には慢性感染を起こす緩増虫体との共通抗原が多数含まれている。したがって、慢性感染者の検体でも各種凝集反応では高抗体価を示すものが多く、急性感染者と慢性感染者の区別が困難である。その点NTPaseは急増虫体に特異的に発現されているため、虫体のNativeな抗原を使用したNTPase-ELISA法の抗体価は色素試験抗体価と相関が良い⁵⁾。しかしNativeなNTPaseを抗原としたELISA法は、虫体の細胞質分画および特異的な単クローン抗体を必要とし、方法が煩雑で費用が非常に高い。大腸菌に生産させた組み換え抗原を用いた場合は、方法の簡便化と大幅な費用の削減が可能となる。

NTPaseには二種類のアイソザイム(NTPase-I, NTPase-II)が知られており、NTPase-IIは全ての株に共通に存在し、NTPase-Iは強毒株にのみ存在する⁶⁾。したがって、どちらのアイソザイムが抗原として最適であるか決定する必要がある。また一般に遺伝子組み換え体抗原は自然界に存在する抗

原とは高次構造が異なるため、抗体との反応性が悪いという欠点がある。そこで今回遺伝子組み換え体NTPase-Iを活性のある型へのrefoldを行いこの点も検討した。ただし全ての株に共通に存在するNTPase-IIはrefoldの方法が発見されておらず、今回は検討していない。今回の結果では、アイソザイムの違い、refoldの有無による抗原の優位性は認められなかった。アイソザイムの違いに関しては、両アイソザイムのアミノ酸配列が約97%も同一であることから納得できる結果であろう。活性のある型へrefoldした抗原は完璧な高次構造ではNativeなものとは多少異なるのことも考えられ、今後の検討課題である。また色素試験抗体価が1024倍と高いにもかかわらず、どのNTPase抗原とも全く反応しないものが一検体存在した。その原因としては患者側の免疫異常が考えられるが、この点も今後の検討課題である。

SAG1はトキソプラズマの急増虫体の表面に存在する蛋白質抗原であるが、膜蛋白質であるため遺伝子組み換え体を作製することがはなはだ困難である。今回ELISA法の抗原として使用するためにN、およびC末端を削り、しかもGSTとの融合蛋白質として発現させたが、ほとんどの色素試験陽性血清が反応しなかった。NTPaseは体外放出型の可溶性の酵素⁷⁾であり、虫体より感染時に大量に放出される。これらの点を考慮すると、NTPaseは単一な遺伝子組み換え体抗原としては最適なもののひとつと思われる。

結 論

トキソプラズマの急増虫体に特異的に存在するNTPaseの遺伝子組み換え体抗原を作製し、これを抗原とした急性トキソプラズマ症の新しい血清検査法の評価を行ったところ、非常に有用な方法であった。

参考文献

- 1) T. Asai, W.J. O'Sullivan, M. Tatibana, A potent nucleoside triphosphate hydrolase from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii* J. Biol. Chem. 258, 6816-6822, 1983

- 2) T. Asai, D.K. Howe, K. Nakajima, T. Nozaki, T. Takeuchi, L. D. Sibley *Neospora caninum*: Tachyzoites express a potent type-I nucleoside triphosphate hydrolase, but lack nucleoside diphosphate hydrolase activity *Exptl. Parasitol.* 90, 277-285, 1998
- 3) K. Nakajima-Nakanoa, T. Asai, A. Makioka, N. Yamashita, N. Matsuo, T. Takeuchi, Evaluation of serodiagnosis of toxoplasmosis by using the recombinant antigens, nucleoside triphosphate hydrolase isoforms and surface antigen 1, expressed in *Escherichia coli* *Int. J. Parasitol.* (submitted)
- 4) A. B. Sabin and H. A. Feldman, Dyes as microchemical indication of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (*Toxoplasma*) *Science* 108, 660-663, 1948
- 5) T. Asai, F. Mizuno, S. Kojima, T. Takeuchi, A. Kobayashi, Y. Suzuki, High correlation in antibody titers between the Sabin-Feldman dye test and an enzyme-linked immunosorbent assay detecting immunoglobulin G antibodies to the nucleoside triphosphate hydrolase of *Toxoplasma gondii* *J. Clin. Microbiol.*, 30, 1291-1293, 1992
- 6) T. Asai, S. Miura, L. D. Sibley, H. Okabayashi, T. Takeuchi, Biochemical and molecular characterization of nucleoside triphosphate hydrolase isozymes from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii* *J. Biol. Chem.*, 270, 11391-11397, 1995
- 7) L. D. Sibley, I. R. Niesman, T. Asai, T. Takeuchi, *Toxoplasma gondii*: Secretion of a potent nucleoside triphosphate hydrolase into parasitophorous vacuole *Exptl. Parasitol.*, 79, 301-311, 1994



Pneumocystis carinii 肺炎症例における 血清KL-6値および β -D-グルカン値に 関する臨床的検討

仲本 敦、健山 正男、比嘉 太、新垣 紀子、伊志嶺朝彦、川上和義、齋藤 厚

琉球大学医学部 第一内科学

研究要旨

AIDSの代表的な日和見感染症である *P. carinii* 肺炎の診断に関し、従来から用いられている染色法は操作性や特異度には優れるが感度の低い点が問題となる。新しい検査法として注目されているPCR法は感度、特異度とも極めて高く優れた検査法であるが、操作性の煩雑さや精度管理、コストなどの問題により一般の検査室にはまだ普及していない。本研究ではこれらの検査法を補う新しい検査法として、間質性肺炎などの指標として注目されている血清KL-6、および内臓真菌症の指標である β -D-グルカン測定の際の *P. carinii* 肺炎診断における有用性について検討した。その結果、KL-6、 β -D-グルカンは *P. carinii* 肺炎の発症初期より上昇を認め、また各呼吸器感染症におけるKL-6、 β -D-グルカンの陽性率に違いがあり両者が相補的な陽性率分布をとるため、両者の同時測定は *P. carinii* 肺炎の診断、鑑別診断法として有用な検査法であること、また両者とも *P. carinii* 肺炎に対する治療反応性に並行して推移し、治療法の選択や治療期間の決定にも有用な情報を与える検査となる可能性があることが明らかとなった。

分担研究者：齋藤 厚

研究協力者：仲本 敦、健山正男、比嘉 太、新垣紀子、伊志嶺朝彦、川上和義

A clinical study of serum KL-6 and β -D-glucan in patients with *Pneumocystis carinii* pneumonia.

Atsushi Nakamoto, Masao Tateyama, Futoshi Higa, Noriko Arakaki, Tomohiko Ishimine, Kazuyoshi Kawakami and Atsushi Saito

First Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of the Ryukyus

目 的

P. carinii 肺炎はAIDSの代表的な日和見感染症である。*P. carinii* 肺炎の診断に関しては、従来より喀痰、気管支洗浄液などの検体を用いたグロコット染色、トルイジンブルー染色、ギムザ染色などの染色法が用いられているが、これらの染色法は操作性や特異度には優れているものの感度が低い点が問題となる。近年、新しい検査法として免疫酵素染色法、蛍光染色法などに加え、様々な病原体の検出に利用されているPCR法が*P. carinii*肺炎に対しても応用されつつある。我々の検討でも¹⁻³⁾、表1に示したように*P. carinii*肺炎の診断に関し、PCR法は感度、特異度も極めて高く優れた検査法であった。しかし操作性の煩雑さや精度管理、コストなどの問題もあり一般の検査室にはまだ普及しておらず、染色法やPCR法に加え、さらに有効で簡便な診断法について検討する必要がある。

血清KL-6抗原は間質性肺炎や肺癌などの有用な指標として最近注目されており^{4,5)}、一般の肺胞性肺炎では上昇しないとされる⁴⁾が、*P. carinii*肺炎やレジオネラ肺炎などでKL-6の上昇を認めた症例の報告も散見される^{6,7)}。また*P. carinii*の嚢子の細胞骨格の主成分が真菌類と共通するβ-D-グルカンであることが明らかとなり⁸⁾、内蔵真菌症診断の有用な指標である血清β-D-グルカンが上昇した*P. carinii*肺炎症例の報告も見られる。

本研究の目的は*P. carinii*肺炎診断における血清KL-6およびβ-D-グルカン測定の有用性を明らかにすることである。

方 法

1. 症例

喀痰または気管支肺胞洗浄液の染色にて*P. carinii*菌体が直接検出されるか、*P. carinii*に対するPCR検査が陽性となり診断の確定した*P. carinii*肺炎10症例、および培養検査などにより*P. carinii*肺炎以外の呼吸器感染症の診断が確定した68例の合計78例を対象とした。対象症例の内訳を表2に示した。対象78症例のうちレジオネラ肺炎を除く54症例はいずれも琉球大学医学部第一内科に入院した症例であり、このうち*P. carinii*肺炎以外の呼吸器感染症例は当科入院感染症例データベースより無作為に抽出した。レジオネラ肺炎24症例のうち2例は当科入院症例であるが、残り22例は全国より当科にレジオネラ肺炎診断の検査依頼があり、血清、喀痰などの諸検体と病歴の送付があった症例の中で、培養、血清抗体価、尿中抗原検出、PCR法などによりレジオネラ肺炎の診断が確定した症例である。

*P. carinii*肺炎10例中、3例はHIV感染症例であり、うち2例は今回の*P. carinii*肺炎発症にてAIDS発症が確認された。*P. carinii*肺炎症例のうち残り7例はいずれも諸基礎疾患に対しステロイドの長期内服中に*P. carinii*肺炎を発症した症例である。

表1 *P. carinii*肺炎の各種診断法
— *P. carinii*肺炎26例、*P. carinii*肺炎以外の肺感染症26例の検討—

方法	材料	感度	特異度	操作性	侵襲性
嚢子染色法 (TBO染色)	喀痰	15.4%	100%	簡便	低
	BALF	65.2%	100%	やや煩雑	やや高い
	TBLB検体	83.0%	100%	煩雑	高い
PCR法	喀痰	100%	94.7%	やや煩雑	低
	BALF	100%	100%	煩雑	やや高い

(琉大第一内科)

表2 対象症例

<i>P. carinii</i> 肺炎10例	
HIV 感染症例	3例
非 HIV 感染症例	7例
<i>P. carinii</i> 肺炎以外の呼吸器感染症例 68例	
一般細菌性肺炎	22例
<i>S. pneumoniae</i>	5例
<i>H. influenzae</i>	5例
<i>M. catarrhalis</i>	2例
<i>K. pneumoniae</i>	2例
<i>S. aureus</i>	4例
その他	4例
レジオネラ肺炎	24例
マイコプラズマ肺炎	3例
肺結核	16例
肺真菌症	3例
カンジダ	2例
アスペルギルス	1例

2. 測定検体

検体は原則として入院時に採取され、清潔操作にて-40℃に凍結保存された血清を用い、血清KL-6およびβ-D-グルカンの測定に供した。また院内発症の呼吸器感染症例では、感染症発症後、有効と考えられる抗生剤の投与開始日に最も近い日に採取され凍結保存された血清を用いた。また一部の症例においては、発症から症状軽快まで経時的に採取された血清を用いて測定を行った。

3. KL-6測定

血清KL-6の測定は、すべての検体をエーザイ筑波研究所に搬入し、マウスのモノクローナル抗体を用いたサンドイッチEIA法によるKL-6測定試薬キット(Eitest KL-6[®]、エーザイ株式会社)を用いて一括測定した。

4. β-D-グルカン測定

血清β-D-グルカンの測定は、すべての検体をエスアールエル八王子ラボに搬入し、カプトガニのG因子系血液凝固因子を用いた発色合成器質法によるβ-D-グルカン測定試薬キット(ファンギテックGテストMK[®]、生化学工業)を用いて一括測定した。

5. 統計学的解析

統計学的解析には Mann-Whitne's U test、Spearman's correlation coefficient by rank test を用いた。

結果

1. 各呼吸器感染症における血清KL-6、β-D-グルカンの比較

各呼吸器感染症例の血清KL-6値の分布を示す(図1)。なお今回の検討症例の中には特発性間質性肺炎や膠原病関連間質性肺炎などの血清KL-6が上昇する疾患を明らかに合併している症例はなかった。各呼吸器感染症の血清KL-6の平均値は*P. carinii*肺炎で1,181±998 U/ml、一般細菌性肺炎301±160 U/ml、肺結核495±352 U/ml、レジオネラ肺炎601±372 U/ml、マイコプラズマ肺炎479±391 U/ml、肺真菌症349±142 U/mlであった。各呼吸器感染症の中で入院時の血清KL-6の平均値が高値であったのは*P. carinii*肺炎、肺結核、レジオネラ肺炎であったが、*P. carinii*肺炎におけるKL-6の平均値は肺結核やレジオネラ肺炎よりも有意に高かった。また間質性肺炎に対する血清KL-6のcut off値である500 U/mlをそのまま今回の肺感染症例にcut off値として適用した場合、*P. carinii*肺炎症例では10例中8例、80.0%が500 U/ml以上で陽性を示した。

次に各呼吸器感染症例の血清β-D-グルカン値の分布を示す(図2)。血清β-D-グルカンの平均値は*P. carinii*肺炎で262±474 pg/ml、一般細菌性肺炎11.4±10.3 pg/ml、肺結核3.3±3.8 pg/ml、レジオネラ肺炎31.1±56.1 pg/ml、マイコプラズマ肺炎3.5±4.4 pg/ml、肺真菌症624±923 pg/mlであった。各呼吸器感染症の中で入院時の血清β-D-グルカンの平均値が高値であったのは*P. carinii*肺炎、レジオネラ肺炎、肺真菌症であったが、*P. carinii*肺炎におけるβ-D-グルカンの平均値はレジオネラ肺炎よりも有意に高かった。肺真菌症例は3例と少なく有意差は検定できなかった。また内臓真菌症に対する血清β-D-グルカンのcut off値である20 pg/mlをそのまま今回の肺感染症例にcut off値として適用した場合、*P. carinii*肺炎症例では8例全例が20 pg/ml以上で陽性を示した。また肺真菌症3例も全例が陽性であった。

血清KL-6のcut off値を500 U/ml、β-D-グルカンのcut off値を20 pg/mlとした場合の各呼吸器感染症例におけるそれぞれの陽性率をまとめて示す(図3)。KL-6とβ-D-グルカンが両者ともに高率に

陽性であったのは *P. carinii* 肺炎のみであった。

今回測定を行った発症初期の血清 KL-6 値および β -D-グルカン値が *P. carinii* 肺炎の診断にどの程度有用であるかについて、各呼吸器感染症における陽性率を基に計算した *P. carinii* 肺炎初期診断に対する感度(sensitivity)、特異度(specificity)、陽性反応的中度(positive predictive value)、陰性反応的中度(negative predictive value)を示す(表3)。血清 KL-6 単独測定による *P. carinii* 肺炎診断の感度は 80.0%、特異度 69.1%、陽性反応的中度 27.6%、陰性反応的中度は 95.9% であった。また β -D-グルカン単独の測定では感度は 100%、特異度 72.7%、陽性反応的中度 47.1%、陰性反応的中度は 100% であった。さらに KL-6 と β -D-グルカンを両方測定することができた 41 例の検討では、KL-6 と β -D-グルカンが両者とも陽性であるもののみを *P. carinii* 肺炎と判定することにした場合、*P. carinii* 肺炎の初期診断に関する感度は 87.5%、特異度 73.7%、陽性反応的中度 63.6%、陰性反応的中度 96.7% であった。

KL-6 (U/ml) 4000
3000
2000
1000
500
0

P. carinii 肺炎 (n = 10) 一般細菌性肺炎 (n = 22) 肺結核 (n = 16) レジオネラ肺炎 (n = 24) マイコプラズマ肺炎 (n = 3) 肺炎球菌症 (n = 3)

P < 0.001 P < 0.001 P < 0.001 P = 0.025

* Mann-Whitney's U test

図1 各呼吸器感染症における入院時血清 KL-6 値の比較

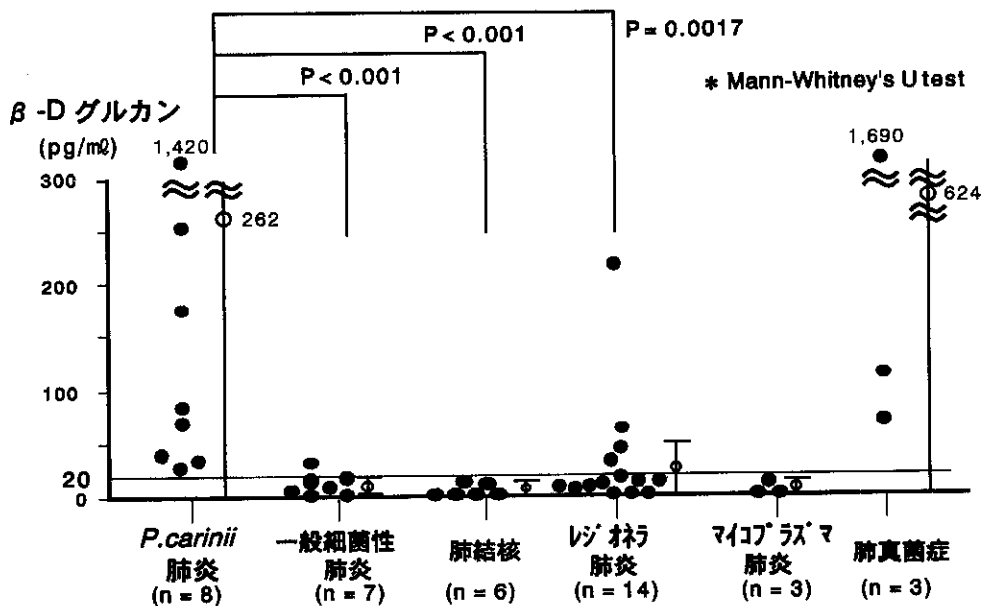


図2 各呼吸器感染症における入院時血清 β -D グルカン値の比較

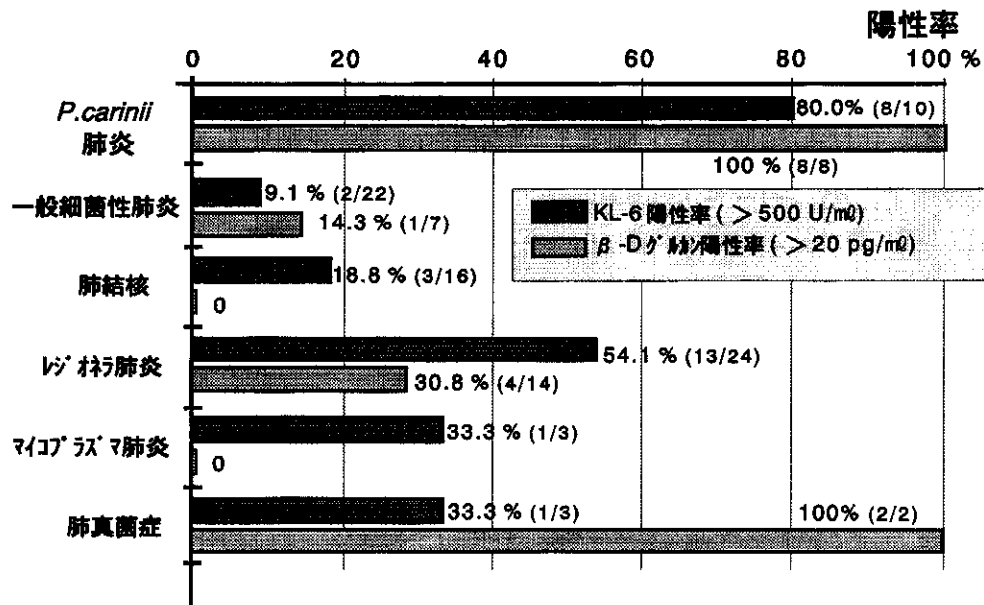


図3 各呼吸器感染症における入院時血清KL-6、β-D グルカンの陽性率

表3 *P. carinii* 肺炎初期診断におけるKL-6、β-Dグルカン単独測定および同時測定の検査機能

* KL-6 測定者 : 78 例	
(<i>P. carinii</i> 肺炎10例、 <i>P. carinii</i> 肺炎以外の呼吸器感染症 68例)	
sensitivity : 8/10 (80.0%)	positive predictive value : 8/29 (27.6%)
specificity : 47/68 (69.1%)	negative predictive value : 47/49 (95.9%)
* β-Dグルカン測定者 : 41 例	
(<i>P. carinii</i> 肺炎8例、 <i>P. carinii</i> 肺炎以外の呼吸器感染症 33例)	
sensitivity : 8/8 (100%)	positive predictive value : 8/17 (47.1%)
specificity : 24/33 (72.7%)	negative predictive value : 24/24 (100%)
* KL-6、β-Dグルカン同時測定者 : 41 例	
(<i>P. carinii</i> 肺炎8例、 <i>P. carinii</i> 肺炎以外の呼吸器感染症 33例)	
sensitivity : 7/8 (87.5%)	positive predictive value : 7/11 (63.6%)
specificity : 29/33 (73.7%)	negative predictive value : 29/30 (96.7%)

2. *P. carinii*肺炎における臨床背景とKL-6、β-D-グルカン値の関連

HIV感染の有無による *P. carinii*肺炎発症初期のKL-6およびβ-D-グルカンの分布の違いについて示す(図4)。HIV感染症例3例のKL-6平均値は2,212 ± 1,391 U/mlであり一方、非HIV感染症例7例の平均値は739 ± 298 U/mlでHIV感染症例の方が有意に高値であった。β-D-グルカンに関してはHIV感染症例2例では平均836 ± 825 pg/mlであり一方、非HIV感染症例6例では71 ± 56 pg/mlとやはりHIV感染症例で高値であった。

*P. carinii*肺炎症例10例に関し、発症から検体採取までの期間とKL-6値、β-D-グルカン値の関連について検討した(図5)。KL-6値に関しては、検体採取までの期間との間に相関係数0.95の極めて強い正の相関が認められた。またHIV症例3例中、2例はいずれも発症から入院、検体測定まで100日以上が経過していた症例であり、KL-6値も高値であった。β-D-グルカン値に関しては、検体採取までの期間との間の相関係数は0.67であり相関性は低かった。発症からの経過が長いHIV症例2例ではやはりβ-D-グルカン値も高値であった。

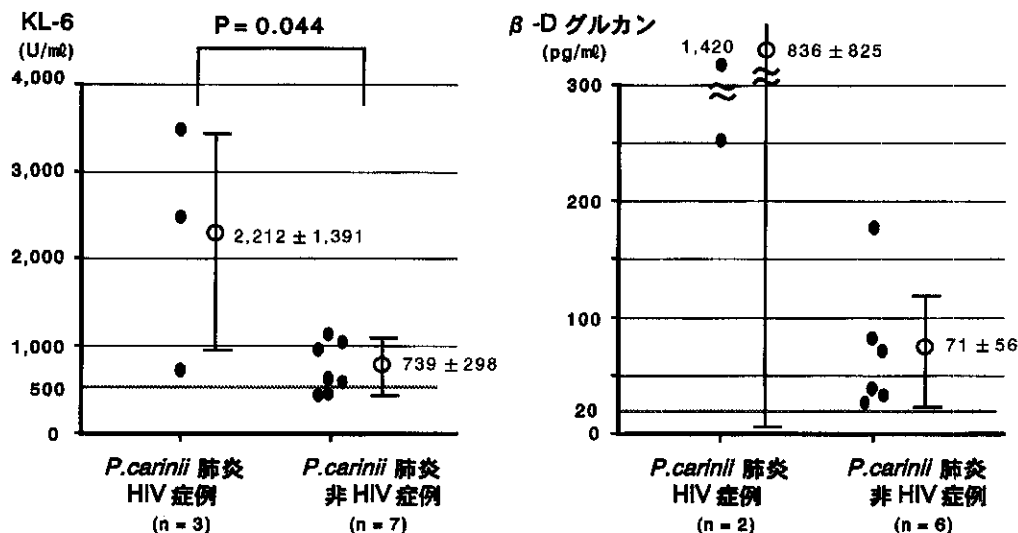


図4 P. carinii 肺炎における HIV 感染の有無と KL-6、β-D グルカン値の関連

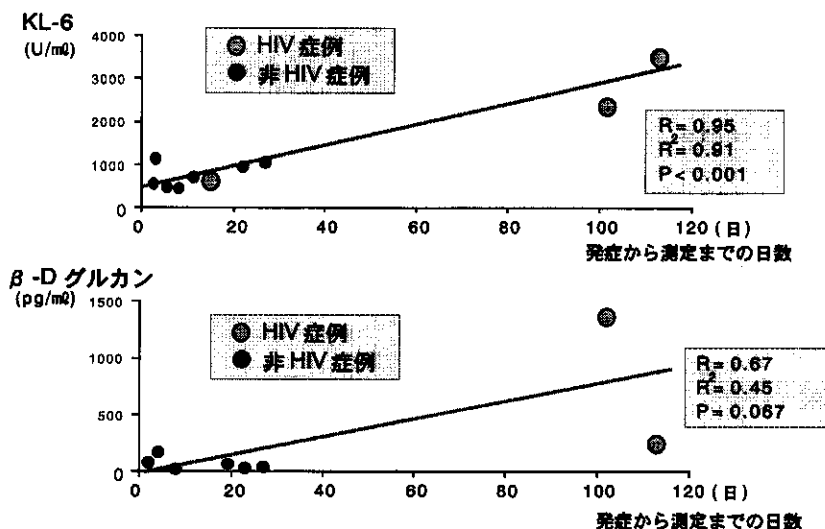


図5 KL-6、β-D グルカン値と罹病期間の関連 P. carinii 肺炎 10 例の検討 (HIV 感染症例 3 例、その他 7 例)

3. P. carinii 肺炎における経時的血清KL-6、β-D-グルカン値の推移

経時的に血清KL-6、β-D-グルカン値を測定できた2例のP. carinii肺炎症例の臨床経過を示す(図6、7)。症例1は51歳男性。1989年7月にHIV感染の診断。1992年2月初旬より乾性咳嗽、発熱出現。労作時息切れも自覚するようになったため、4月1日に当科外来受診。胸写上、両側肺門部の大血管陰影の不鮮明化と軽度の瀰漫性磨りガラス影を認め、臨床経過よりP. carinii肺炎が疑われ入院となる。同日気管支鏡検査を施行し、気管支洗浄液のトルイジンブルー染色にて多数のP. carinii嚢子が確認されP. carinii肺炎およびAIDS発症と診断。ST合剤12g/日の内服を開始するも、悪心、嘔吐などの

消化器症状、全身皮膚の紅斑、肝障害が出現、ST合剤を減量したがコントロールできず、ST合剤中止。ペンタミジンの吸入に加え、点滴静注開始するも、開始1週間目頃より錯乱状態を伴う低血糖発作を繰り返すようになりペンタミジン中止。この間、発熱は持続し呼吸器症状も改善せず。最終的には4月下旬よりファンシダールの内服とペンタミジンの吸入を継続し次第に解熱、呼吸器症状の改善を認めた。この症例では入院時の保存血清が入手できず、有効な抗生剤が継続投与可能となった4月30日から後の血清を用いてKL-6およびβ-D-グルカンの経時測定を行った。血清KL-6は当初2,469 U/mlであったが徐々に低下し、約1カ月後の6月3日には1,482 U/ml、2カ月後の7月

6日には722 U/mlまで低下していた。同様にβ-D-グルカンも1カ月後の5月18日にはまだ236 pg/mlと高値であったが7月6日には43 pg/mlに改善していた。

症例2は34歳の女性で1985年に成人ステイル病を発症。病状のコントロールが困難で再発を繰り返し、長期にプレドニン20~30mg/日を内服していた。97年1月中旬より発熱、労作時息切れを認めるようになり1月29日当科入院。著明な低酸素血症に加え、胸写上、両側中下肺野に瀰漫性の斑状~磨りガラス影が認められた。当初細菌性肺炎が疑われ一般抗生剤治療開始するも症状改善な

し。*P. carinii*肺炎を疑い2月10日に喀痰の*P. carinii*に対するPCR検査を施行したところ陽性であり*P. carinii*肺炎と診断。ST合剤6g/日開始にて症状は徐々に軽快。経過中、ステイル病増悪によるショック状態となったが、ステロイドパルス療法などを施行し軽快した。本症例では、入院初期の一般抗生剤使用中においてはKL-6、β-D-グルカンは上昇し続けたが、ST合剤を開始してからは両者とも速やかに低下し、18日後の2月28日にはKL-6は370 U/ml、β-D-グルカンは13.9 pg/mlと陰性化していた。

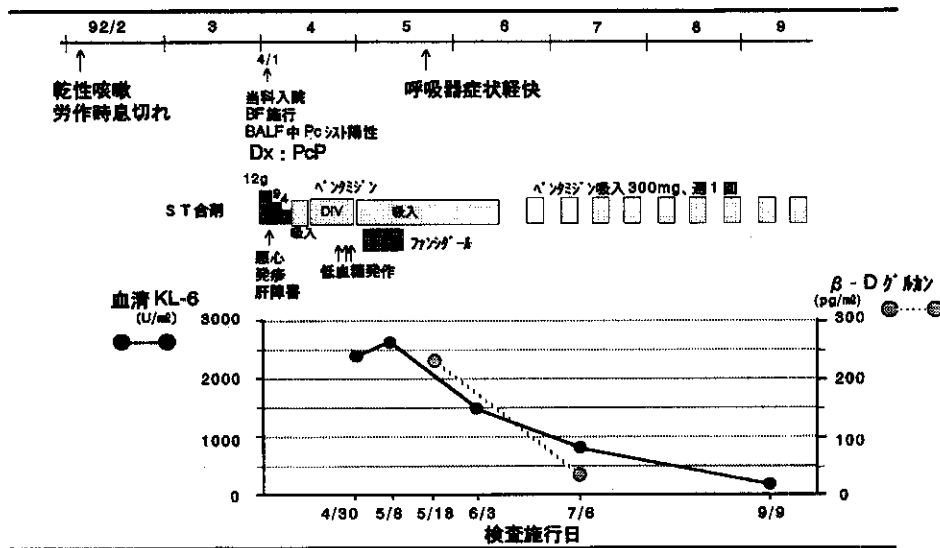


図6 症例1：51歳 男性 診断：AIDS、*P. carinii*肺炎

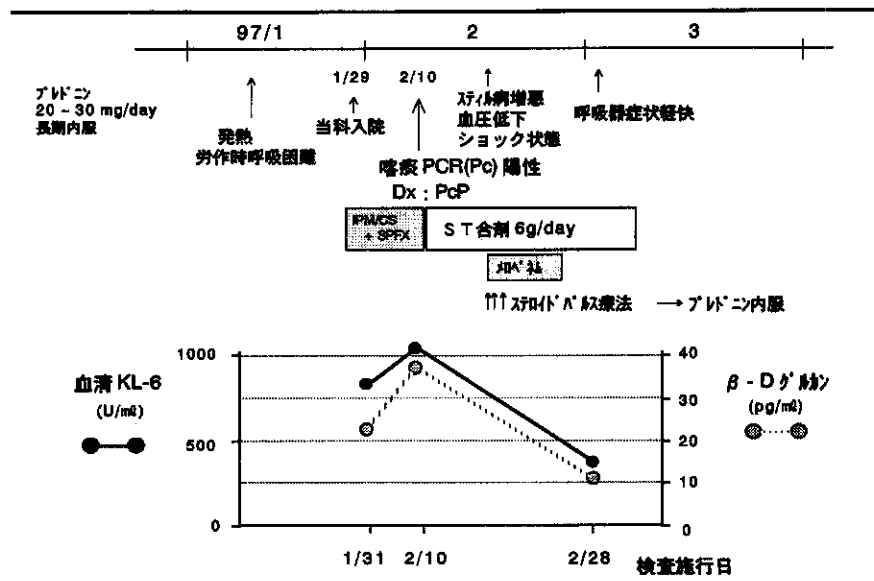


図7 症例2：34歳 女性 診断：成人ステイル病(1985年発症)、ステロイド長期内服、*P. carinii*肺炎