

表3 胸部単純写真所見

症例数	34	
陰影の分布		
両肺	33	(97.1%)
片側肺	1	(2.9%)
上肺野優位		
中肺野優位	9	(26.5%)
下肺野優位	1	(2.9%)
全肺野	5	(14.7%)
全肺野	19	(55.9%)
陰影の性状		
スリガラス影	16	(47.1%)
浸潤影	2	(5.9%)
スリガラス影+浸潤影	16	(47.1%)

表4 胸部CT所見

症例数	39	
病変の分布		
中心性分布	12	(30.7%)
末梢性分布	2	(5.1%)
びまん性/斑状散布	25	(64.1%)
peripheral sparing	14	(35.9%)
斑状分布		
モザイクパターン	29	(74.4%)
モザイクパターン	14	(35.9%)
陰影の性状		
スリガラス影	25	(64.1%)
スリガラス影+浸潤影	12	(30.8%)
浸潤影	0	(0%)
その他(小斑状影の散布等)	2	(5.1%)
小葉間隔壁の肥厚	6	(15.3%)
線状影	11	(28.2%)
胸水	12	(30.7%)

表5 治療後の胸部CT

症例数	11	
後遺症無し	8	
線維化遺残	3	
嚢胞・気胸	0	

比へ多数を占めた。陰影の性状では、すりガラス影か主体であるものと、スリガラス影と浸潤影の両者が見られるものかそれぞれ16例ずつ(各47.1%)で浸潤影主体は2例(5.7%)であった。

胸部CTの評価可能例は39例であった(表4)。病変分布は、中心性分布12例(30.7%)、びまん性/斑状分布25例(64.1%)で、末梢性分布は2例(5.1%)であった。Peripheral sparingか14例(35.9%)に見られた。斑状分布29例(74.4%)中、モザイクパターンを14例に認めた。陰影の性状では、スリガラス影主体のもの25例、スリガラス影と浸潤影の両者が見られるもの12例で浸潤影か主に見られたものは無かった。胸水か12例(30.7%)に見られた。治療後の画像所見では嚢胞および気胸の合併は見られなかった(表5)。

D 考察

現在カリニ肺炎の画像状の特徴とされるものは主にAIDS例で集積されてきたものである。AIDS例の報告^{2) 5)}では、両側に分布し、特に下葉優位であること、斑状のスリガラス影、中心部あるいは肺門中心の分布、嚢胞形成、気胸の合併などである。本研究の対象である免疫疾患合併例では、陰影の分布が両側で全肺野あるいは上肺野中心に分布する例が多かった。

胸水は3割に見られたか、AIDS合併カリニ肺炎では稀であると報告されており⁶⁾対比の際立つ所見である。この原因としては、胸水を合併し得るSLEなどか原疾患として多いことなどか考えられるか、感染症に関する小委員会報告にあるとおり、原疾患に十分な治療が行われた後の発症であることから、カリニ自体により胸水が生じた可能性を否定できない。胸水の性状は今回の研究では明らかではない。

胸部画像所見上、発症から極期に至る期間は5.3±2.8日であった。AIDS合併カリニ

肺炎では、数週間から数ヶ月にわたる亜急性の発症^{1) 2)}とされている。上記の両期間は厳密には同一のものではないが、AIDS例に比へ急速な進行かみられるものと考えられる。非AIDS例のカリニ肺炎は比較的急速な進行か見られる^{1) 7)}との従来の報告に矛盾しない結果であった。

治癒後の画像所見では、嚢胞形成、気胸は1例も見られなかった。これらはAIDS例でのカリニ肺炎ではしばしば見られる所見^{3) 8)}であり、対比される所見であると考えられた。カリニ肺炎における嚢胞、気胸はHIV陽性例に多いとされているか、HIV陰性例でも報告されている⁹⁾。しかし、本研究では嚢胞、気胸は確認できず、non-HIV例での肺構造の破壊の少なさが再確認される結果であった。

D 結論

免疫疾患に合併するカリニ肺炎は、進行が急速で、下肺野優位よりも上肺野優位が多く、胸水合併例かみられ、気胸、嚢胞はみられないなどHIV/AIDS例とは異なる特徴が明らかとなった。

謝辞 画像の検討に加わっていたいた都立駒込病院放射線科の酒井文和先生に深謝致します。

参考文献

1) Kovacs JA, et al *Pneumocystis carinii* pneumonia A comparison between patients with acquired immunodeficiency syndrome and patients with other immunodeficiencies

Ann Intern Med 1984, 100 663-671

2) Fraser RS, et al *Pneumocystis carinii* Fraser and Pare's Diagnosis of diseases of the chest, 4th ed pp909-916, W B Saunders, Philadelphia,1999

3) Hartman TE, et al Diagnosis of thoracic complication in AIDS accuracy of CT Am J Roentgenol 1994, 162 547-553

4) Kuhlman JE, et al *Pneumocystis carinii* pneumonia spectrum of parenchymal CT findings Radiology 1990, 175 711-714

5) Bergin CJ, et al *Pneumocystis carinii* pneumonia CT and HRCT observations J Comput Assist Tomogr 1990,14 756-759

6) Affessa B Pleural effusion and pneumothorax in hospitalized patients with HIV infection the Pulmonary Complications, ICU support, and Prognostic Factors of Hospitalized Patients with HIV (PIP) Study Chest 2000 ,117(4) 1031-1037

7) Ewig S, et al Clinical characteristics and outcome of *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV-infected and otherwise immunosuppressed patients Eur Respir J 1995 8 1548-1553

8) Boiselle PM, et al The changing face of *Pneumocystis carinii* pneumonia in AIDS patients Am J Roentgenol 1999 , 172 1301-1309

9) 松田知之 他 後天性免疫不全症候群に関連なくカリニ肺炎を契機に多発性肺嚢胞を急激に形成した一例 日呼吸会誌 2001,39 508-513

8. 膠原病に併発するカリニ肺炎の誘発喀痰を用いたDNA診断と 1次予防基準に関する研究

分担研究者 岡田 洋右 (産業医科大学医学部 第一内科 講師)
研究協力者 齋藤 和義 (産業医科大学医学部 第一内科 講師)
田中 良哉 (産業医科大学医学部 第一内科 教授)

研究要旨

膠原病に併発するカリニ肺炎は時に致命的となる重要な合併症である。我々は、ネフライサーをかけて採取する誘発喀痰を検体としたカリニ感染症のDNA診断を確立し、高い検出率、特異性および迅速性などにおける有用性を確認した。さらに、本法を用いたカリニ特異的DNA診断により膠原病に併発するカリニ肺炎の臨床的特徴の再評価し、その情報をもとに1次予防基準を検討したところ、①経口ステロイド単独ではPSL換算1 mg/kg以上 ②PSL換算0.5 mg/kg以上かつ免疫抑制薬併用者 ③IV-CY併用 ④リンパ球400/mm³、IgG 700 mg/dl以下で発症のリスクが高いと考えられた。この基準によりST合剤服用あるいはペンタミン吸入による1次予防を施行したところ、カリニ肺炎の発症は完全に抑止し得た。

A 研究目的

膠原病に併発するカリニ肺炎は、診断が遅れると致死的になる重要な日和見感染症である。カリニ肺炎の確定診断は、気管支肺胞洗浄液中の*Pneumocystis carinii*をクロコト染色し鏡顕で検出することによってなされる。しかしながら、特異性に問題があること、侵襲的な気管支鏡検査を要すること、気管支洗浄にて他の細菌・真菌感染などを拡大するリスクがあるなどの問題も多い。実地臨床においては、カリニ肺炎が疑われた時に可急的に気管支鏡を施行することはしばしば困難であり、より非侵襲的・簡便に検体採取でき、高い特異性・検出率をもった検査が望まれる。我々は、ネフライサー吸入後に採取する誘発喀痰を検体としたカリニ肺炎のDNA診断を試み、検出率、

特異性、迅速性などにおきその有用性を検討するとともに、膠原病に併発するカリニ肺炎の臨床的特徴の再評価とその情報をもとに1次予防基準を検討した。

B 研究方法

1998年から約5年の間に 1) 乾性咳嗽、労作時息切れ、発熱を認め、2) 進行性低酸素血症、3) 胸写・胸部CTにて間質性肺炎を画像上呈することより、臨床的にカリニ肺炎が強く疑われた膠原病患者43症例に誘発喀痰を用いたカリニ特異的DNA診断を施行。生食10 mlを超音波ネフライサーにて吸入した後、喀出された喀痰(誘発喀痰)を検体として採取。Dithiothreitol、proteinase K処理後、phenol/chloroform抽出、エタノール沈殿にてDNAを調整。

100 pM Primer 1 5' - AGTTACGGCCATACCTCAGA- 3', Primer 2 5'-AAAGCTACAGCACGTCGTAT- 3'とともにサーマルサイクラーにてPCRを施行。95°C 1分-55°C 1分 - 72°C 90秒 35 cycleにより増幅されたサンプルの一部を3%アガロースゲルにて電気泳動し、124bpの特異的バンドとして検出した。

(倫理面への配慮)

被験者の自由な選択の保証。

被験者のプライバシー保護に関する対策。
被験者から採取した生体試料の取り扱い。

C 研究結果

上記の臨床症状から強くカリニ肺炎が疑われた膠原病患者42名中23名 (SLE 8名、PM/DM 5名、MPA 3名、MCTD 2名、MRA 2名、その他 3名) においてカリニDNA陽性と診断された。本法による検出率は54.5%で鏡検診断の陽性率 (4.5%) に比して高い検出率を示した。カリニ肺炎発症時の患者背景を検討したところ、①経口ステロイド単独ではPSL換算1 mg/kg以上②PSL換算 0.5 mg/kg以上かつ免疫抑制薬併用者 (CPM 1名、MTX 1名、AZA 1名、CsA 2名) ③IV-CY施行者 (10名) においてカリニ肺炎発症のリスクが高いと考えられた。一方、陽性者では、WBC、リンパ球数、IgGに関して有意に低値を、 β クルカンは高値を示した。また、④リンパ球 400/mm³、IgG 700 mg/dl以下で発症のリスクが高いと考えられた。以上①~④のリスクのある該当患者に対して、ST合剤 2 g/隔日内服あるいはペンタミン300 mg/月吸入などの1次予防を施行したところ、以降カリニ肺炎発症者は皆無となった。

D 考察

誘発喀痰を用いたカリニ肺炎のDNA診断は、カリニ肺炎を疑った時点ですぐに検体を採取することかてき、高い検出率で最

短8時間程度にて結果が得られることより、迅速性 感度に優れる検査と考えられた。また、PCR診断では高感度ゆえに、偽陽性がしばしば問題となるか、正常人および慢性閉塞性呼吸器疾患など他の呼吸器疾患患者由来の誘発喀痰ではカリニDNAは検出されなかった。さらに、DNA診断にて陽性と診断した症例は、ST合剤による治療開始後、臨床的改善とともに2週間前後でカリニDNAが消失することを確認しており、本検討に用いたPCRの感度では偽陽性は無いと考えられた。

本法により検討したカリニ肺炎併発者の患者背景の検討により、ステロイド単独使用1 mg/kg以下では基本的にまずカリニ肺炎は発症しないと考えられる。一方、免疫抑制薬併用の際には少量のステロイド使用時においても極めて十分な注意を要するものと考えられた。また、1次予防基準を設定して実践したところ、カリニ肺炎の発症は皆無となり、1次予防の徹底により発症は抑止できるものと考えられた。

E 結論

以上より、ステロイド大量あるいは免疫抑制薬を併用して加療している膠原病患者の一部では、カリニ肺炎の1次予防はルチンになされるべきであると考えられる。しかしながら、1次予防に関する明確な適応基準、1次予防薬の選択などに関しては未だ明確な基準は設定されていない。既に、HIV患者へのST合剤投与の1次予防基準は設定されているか、膠原病患者においては薬剤アレルキーの頻度が高く、HIV感染患者の1次予防基準をそのまま適応することは適当でない。本研究のような膠原病患者の治療背景を含む特性を正しく評価した上で、独自のカリニ肺炎の1次予防基準および予防方法の設定が必要と考えられる。

F 健康危険情報

なし。

G 研究発表

1 論文発表

- 1) 齋藤和義、田中良哉 膠原病疾患におけるカリニ肺炎_膠原病疾患に併発するカリニ感染症の臨床上の留意点、PCR法によるDNA診断の臨床応用_日本臨床免疫学会誌 (2002) 25 310-318
- 2) 齋藤和義、田中良哉 膠原病疾患に併発するカリニ肺炎の早期診断と1次予防 九州リウマチ (in press)
- 3) Saito K, Nakayamada S, Tanaka Y, et al
Detection of *Pneumocystis carinii* by DNA amplification in patients with connective tissue diseases Reevaluation of clinical features of *P. carinii* pneumonia in rheumatic diseases Rheumatology (in press)

2 学会発表

- 1) 膠原病に合併するカリニ肺炎のDNA診断による臨床像の再評価 齋藤和義、中塚敬輔、中山田真吾、中野和久、徳永美貴子、辻村静代、澤向範文、名和田雅夫、田中良哉 (第47回日本リウマチ学会)
- 2) 膠原病に併発するカリニ肺炎の臨床的特徴とPCR法による早期診断の重要性 齋藤和義、中塚敬輔、中山田真吾、中野和久、澤向範文、辻村静代、徳永美貴子、名和田雅夫、田中良哉 (第25回九州リウマチ学会)

H 知的財産権の出願 登録状況

(予定含む。)

1 特許取得

なし

2 実用新案登録

なし

3 その他

なし

9. ステロイド大量療法下のリウマチ性疾患患者におけるカリニ肺炎発症の危険因子同定および予防的化学療法の有効性に関する研究

分担研究者 萩山 裕之 (東京医科歯科大学医学部 膠原病 リウマチ内科 助手)

研究要旨

ステロイド剤 (ス剤) 大量療法に合併するカリニ肺炎 (PCP) の予防法を確立するため、ロジスティック回帰分析により統計モデル作製、PCPの独立危険因子同定およびtrimethoprim-sulfamethoxazole (TMP/SMX) 予防投与の有効性を検討した。統計モデルの正診率は95.1%で、ス剤初期投与量 (10mg増加あたりのオッズ比2.01) がPCP発症の独立危険因子であった。統計モデルによるPCP発症予測確率が一定値以上を示した患者群において、TMP/SMX予防投与はPCP発症を有意に抑制した。PCP発症高リスク患者には積極的なTMP/SMX予防投与が推奨される。

A 研究目的

カリニ肺炎 (Pneumocystis carinii pneumonia, PCP) はhuman immunodeficiency virus (HIV) 感染症などの免疫抑制状態においてしばしば遭遇する重症かつ致死的な感染症であり¹⁸⁾、リウマチ性疾患患者においても2.6~4.3%に発症する^{9, 10)}。リウマチ性疾患患者では、ス剤大量療法や末梢血中リンパ球数減少などがPCP発症に関連すると報告されている^{9, 11-15)}。しかし、これらの解析は単変量解析で実施されておりPCP発症との因果関係が明確にされておらず、PCP発症を予測するためには、多変量解析を用いた独立危険因子の同定が必要である。

近年、HIV感染者におけるPCPに対するTMP/SMX予防投与の有効性がpentamidine isetionate、dapsonを対照薬としたランダム化比較試験により報告された¹⁶⁾。一方、リウマチ性疾患患者では、同様なランダム化比較試験が行われておらず、PCPに対するTMP/SMX予防投与に関

する真の有効性は明らかにされていない。しかし、PCPが致死的な疾患であることを考慮すると、プラセボ対照ランダム化比較試験は倫理的に施行し難い。そこで、我々はロジスティック回帰分析によりPCP発症予測確率を算出する統計モデルを作製し、PCP発症に関する独立危険因子を同定した。さらにこの統計モデルを用いて、ある一定値以上のPCP発症予測確率を有する患者を抽出し、case-control研究によりス剤大量療法下のリウマチ性疾患患者におけるPCP発症に対するTMP/SMX予防投与の有効性を検討した。

B 研究方法

1) 対象 1998年7月から2002年4月における当科入院患者のうちprednisolone (PSL) 30mg/日以上¹⁷⁾の投与を受け6ヶ月以上経過観察されたリウマチ性疾患患者124例。患者の内訳は、全身性エリテマトーテス53例、多発性筋炎 皮膚筋炎16例、血管炎症候群

12例、関節リウマチ12例、成人発症ステイル病9例、混合性結合組織病7例、強皮症4例、オーバーラップ症候群2例、シェーレン症候群2例、ヘーチェット病1例、その他6例。TMP/SMXの予防効果を検討するため、pentamidine isetionate予防投与例は除外した。

2) PCP診断基準 臨床所見および画像所見がPCPを強く示唆し、*P. carinii*の菌体またはDNAが呼吸器検体より検出された場合または*P. carinii*に有効な薬剤のみで臨床所見 画像所見が改善した場合にPCPと診断した¹⁷⁾。本研究でPCPと診断された9例全例か、①発熱、乾性咳嗽、呼吸困難、②低酸素血症、③胸部X-p、CTにおけるび慢性浸潤影、④血清β-Dクルカン値上昇の4項目の特徴を有していた。

3) TMP/SMXの予防投与方法 TMP/SMX予防投与は主治医の判断により施行され、TMP/SMX (ハクタ®) 3錠/日 週3回あるいは1錠/日 連日投与の方法で行われた。

4) 患者群分類 TMP/SMX予防投与の有無により予防投与群42例と非予防投与群82例に分類した。PCP発症は非予防投与群から認められた。

5) テータ収集 全てのテータは入院診療録から収集した。PCP非発症群は入院期間中、PCP発症群は入院時からPCP発症時までのテータを採用した。ス剤開始2ヶ月後の血清IgG減少率 減少量は式<減少率=(ス剤開始前血清IgG値-ス剤開始2ヶ月後血清IgG値) /ス剤開始前血清IgG値、減少量=ス剤開始前血清IgG 値-ス剤開始2ヶ月後血清IgG値>で計算した。

6) 統計学的解析手順と方法

①PCP発症群の臨床的特徴 PCP発症群の臨床的特徴を同定するため、TMP/SMX非予防投与群82例(PCP発症群9例、非発症群73例)を用いて単変量解析を実施した。両群の比較にはFisher's exact test, Mann-

Whitney's U-testを使用した。

②PCP発症予測統計モデルの作製 単変量解析で有意差を認めた項目のうち、ス剤初期投与量、ス剤総投与量、免疫抑制剤併用の有無、ス剤開始1ヶ月後のリンパ球数、血清アルブミン値の5項目を統計モデル作製に用いる予測変数として採用した。これら5つの予測変数の全ての組み合わせ(31通り)に対してロジスティック回帰分析を行い、PCP発症予測統計モデルを作製した。ロジスティック回帰分析では、 (X_1, X_2, \dots, X_p) の予測変数を有する患者のPCP発症リスクスコア(S)は以下の式で与えられる。

$$S = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \dots + \beta_p X_p$$

ここで、 β_i を予測変数 X_i に対する回帰係数と呼び、これらの値はロジスティック回帰分析により算出される。さらに、各統計モデルにおける重回帰係数(R^2)、最大対数尤度(ML)、Akaike's information criteria (AIC) ($AIC = -2ML + 2q$ qはパラメーター数)¹⁸⁾を求め、最適なPCP発症予測統計モデルを選定した。ある統計モデルの R^2 が1に近いほど、AICが小さいほど、優れた統計モデルと考えられる。選定した統計モデルを用いて、個々の症例におけるPCP発症予測確率 $P(x)$ を以下の式で算出した。

$$P(x) = 1 / (1 + e^{-S})$$

$P(x) = 0.5$ をcut-off値とし、 $P(x) \geq 0.5$ を $P(x)$ 高値群、 $P(x) < 0.5$ を $P(x)$ 低値群として陽性反応適中度(PPV)、陰性反応適中度(NPV)、予測正診率(PA)、感度、特異度、正診率を求めた。

③PCP発症独立危険因子の同定 上記の方法で選定した統計モデルを用い、各予測変数のオッズ比(OR)およびORの95%信頼区間(95%CI)を計算した。

④TMP/SMX予防投与有効性の解析 上記②の方法で選定した統計モデルを用い、各症例のテータを予測式に代入し、124例に

おけるそれぞれのP(x)を計算した。一定値以上のP(x)を有する症例をPCP高リスク群と考え、 $P(x) \geq 0.1$ 、 $P(x) \geq 0.3$ の患者を対象としてTMP/SMX予防投与有効性をFisher's exact testにより検討した。

C 研究結果

1) PCP発症群の臨床的特徴 (Table 1)

TMP/SMX非予防投与群 (N=82) におけるPCP発症群 (N=9) と非発症群 (N=73) の比較において、年齢、性別、喫煙、IPの有無、基礎疾患では有意差は認められなかった。治療内容に関してはPCP発症群でス剤初期投与量 ($p=0.0008$)、ス剤総投与量 ($p=0.0007$) が有意に高く、ス剤パルス療法併用 ($p=0.026$) や免疫抑制剤併用 ($p=0.016$) が有意に高頻度であった。検査所見においては、PCP発症群でス剤開始1ヶ月後のリンパ球数 ($p=0.0037$)、ス剤開始前血清総蛋白 ($p=0.029$)、ス剤開始前血清アルブミン値 ($p=0.0011$) は有意に低値を示し、ス剤開始2ヶ月後の血清IgG減少率 ($p=0.0012$)、減少量 ($p=0.018$) は有意に高値を示した。

2) ス剤大量療法下におけるPCP発症予測のための統計モデル作製 (Table 2) 単変量解析で同定された項目の中から、以下の手順でPCP発症予測統計モデル作製に用いる予測変数を選択した。その結果、下記のA-Eを予測変数とし、〈対象と方法〉に示した手順によりロジスティック回帰分析を用いて31通りのPCP発症予測統計モデルを作製した。これらの統計モデルのうちAICが最小でR²が最大であった統計モデルを以下の検討でPCP発症予測統計モデルとして用いた。この統計モデルではPCP発症リスクスコア (S) は以下の式で与えられる。

$$S = -0.731 + 0.0701 \times A + 0.00026 \times B - 0.00206 \times C - 1.961 \times D + 1.697 \times E$$

A ス剤初期投与量

B ス剤総投与量

C ス剤開始1ヶ月後の末梢血リンパ球数

D ス剤開始前の血清アルブミン値

E 免疫抑制剤併用の有無

〈対象と方法〉に示した式により、TMP/SMX非投与群の各症例 (N=82) におけるPCP発症予測確率 (P(x)) を計算した。P(x)=0.5をcut-off値とした場合、この統計モデルではPPV=85.7%、NPV=96.0%、PA=95.1%、感度66.7%、特異度98.6%、正診率95.1%であった (Table 3)。

3) PCP発症に寄与する独立危険因子の同定 (Table 4) 各予測変数の回帰係数を用いORを計算したところ、ス剤初期投与量10mg増加前後でのORが2.01 (95%CI 1.04-3.92、ス剤初期投与量を10mg/日増やすとPCP発症オッズが2.01倍になる) であり有意な独立した危険因子であると考えられた。ス剤総投与量、ス剤開始1ヶ月後の末梢血リンパ球数、ス剤開始前血清アルブミン値、免疫抑制剤併用のORと95%CIの結果からは、これらの予測因子はPCP発症には関与するものの、独立した危険因子ではないと考えられた。

4) PCP発症の高リスク群におけるTMP/SMX予防効果 (Table 5) 124例全例のP(x)を算出し、 $P(x) \geq 0.1$ (N=34)、 $P(x) \geq 0.3$ (N=20) の症例をPCP発症高リスク群として抽出した。どちらの高リスク群においても4分割表を用いた解析によりTMP/SMX予防投与の有効性が示された ($p=0.011$ 、 $p=0.015$)。

5) TMP/SMXの有害事象 49例中7例が有害事象のため中止された。有害事象は腎障害、皮疹、白血球減少、血小板減少、嘔気、発熱であり投与中止のみで改善した。

D 考察

単変量解析の結果から、PCP発症群ではス剤初期投与量、ス剤総投与量が高値で、ス剤パルス療法併用、免疫抑制剤併用が高

頻度であり、ス剤開始1ヶ月後のリンパ球数低下および8週間後の血清IgG低下を併せると、PCP発症群は非発症群に比較してより強力な免疫抑制療法を受けた immunocompromised host であると考えられた。

リウマチ性疾患患者におけるPCPに関するこれまでの報告^{9,12,14,15)}の殆どは、単変量解析によるPCP発症群と非発症群間の比較である。本研究におけるロジスティック回帰分析によりス剤初期投与量がPCPに対する独立危険因子であり、ス剤大量療法下においてPCP発症に十分に留意する必要があることか示された。

さらに、統計モデルにより各症例のPCP発症予測確率を算出し、PCP発症高リスク群におけるTMP/SMX予防投与の有効性に関する検討を行った。これにより、ス剤大量療法下のリウマチ性疾患患者中のPCP発症高リスク群におけるTMP/SMX予防効果の有効性が強く示唆された。

E 結論

ス剤大量療法下のリウマチ性疾患患者中のPCP発症高リスク患者において、TMP/SMX予防投与が強く推奨される。

<参考文献>

- 1 Hughes WT "Pneumocystis carinii Infection" An Update Medicine 1992, 71 175-8
- 2 Phair J, Munoz A, Detels R, Kaslow R, Rinaldo C, Saah A, et al The risk of *Pneumocystis carinii* pneumonia among men infected with human immunodeficiency virus type 1 N Engl J Med 1990, 322 161-5
- 3 Vogel CL, Cohen MH, Powell RD, DeVita VT *Pneumocystis carinii* pneumonia Ann Int Med 1968, 68 97-108
- 4 Le Clair RA Descriptive epidemiology of

- interstitial pneumocystic pneumonia an analysis of 107 cases from the United States, 1955-1967 Amer Rev Resp Dis 1969, 99 542-7
- 5 Walzer PD, Perl DP, Krogstad DJ, Rawson PG, Schultz MG *Pneumocystis carinii* pneumonia in the United States Epidemiologic, diagnostic, and clinical features Ann Intern Med 1974, 80 83-93
- 6 Burke BA, Good RA *Pneumocystis carinii* Infection Medicine (Baltimore) 1973, 52 23-51
- 7 Pisanı RJ, Wright AJ Clinical utility of bronchoalveolar lavage in immunocompromised hosts Mayo Clin Proc 1992, 67 221-7
- 8 Hughes WT, Feldman S, Aur RJA, Verzosa MS, Hustu HO, Simone JV Intensity of immunosuppressive therapy and the incidence of *Pneumocystis carinii* pneumonitis Cancer 1975, 36 2004-9
- 9 Liam CK, Wang F *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with systemic lupus erythematosus Lupus 1992, 1 379-85
- 10 Okada J, Kadoya A, RANA M, Ishikawa A, Iikuni Y, Kondo H Efficacy of sulfamethoxazole-trimethoprim administration in the prevention of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with connective tissue disease Kansenshogaku Zasshi 1999, 73 1123-9
- 11 Godeau B, Perronne VC, Huong DLT, Guillevin L, Magadur G, Bandt MD et al *Pneumocystis carinii* pneumonia in the course of connective tissue disease report of 34 cases J Rheumatol 1994, 21 246-51
- 12 Porges AJ, Beattie SL, Ritchlin C, Kimberly RP, Christian CL Patients with systemic lupus erythematosus at risk for *Pneumocystis carinii* pneumonia J Rheumatol 1992, 19 1191-4
- 13 Chechanı V, Bridges A *Pneumocystis*

carinii pneumonia in patients with connective tissue disease Chest 1992, 101 375-8

14 Kadoya A, Okada J, Iikuni Y, Kondo H Risk factors for *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with polymyositis/dermatomyositis or systemic lupus erythematosus J Rheumatol 1996, 23 1186-8

15 Godeau B, Mainardi JL, Thoraval FR, Hachulla E, Guillevin L, Du LTH et al Factors associated with *Pneumocystis carinii* pneumonia in Wegener's granulomatosis Ann Rheum Dis 1995, 54 991-4

16 Bozzette SA, Finkelstein DM, Spector SA, Frame P, Powderly WG, He W et al A randomized trial of three antipneumocystis agents in patients with advanced human immunodeficiency virus infection N Engl J Med 1995, 332 693-9

17 Schneider MME, Hoepelman AIM, Eeftink Schattenkerk JKM, Nielsen TL, Graaf Y, Frissen JPHJ et al A controlled trial of aerosolized pentamidine or trimethoprim-sulfamethoxazole as primary prophylaxis against *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with human immunodeficiency virus infection N Engl J Med 1992, 327 1836-41

18 Akaike H Information theory and an extension of the maximum likelihood principle In Petrov BN, Csaki F, editors 2nd International symposium on information theory Budapest Akademiai Kaido, 1973 267-281

ST合剤非予防投与群におけるPCP発症群と非発症群の比較
臨床的特徴と検査所見(単変量解析)

	PCP (+) (N=9)	PCP (-) (N=73)	p 値
ステロイド初投与量 (mg/day)	578 ± 16.4	38.9 ± 11.8	0.0008
ステロイド総投与量 (mg)	7530 ± 5123	2572 ± 2607	0.0007
ステロイド併用	6	20	0.026
免疫抑制剤併用	5	12	0.016
1ヶ月後リンパ球数 (/μl)	476 ± 350	1229 ± 1019	0.0037
2ヶ月後血清IgG減少率 (%)	58.3 ± 15.1	31.2 ± 19.7 *	0.0012
2ヶ月後血清IgG減少量 (mg/d)	1156 ± 888	592 ± 598 *	0.018
血清総蛋白 (g/d)	5.7 ± 1.4	6.6 ± 1.1	0.029
血清アルブミン (g/d)	2.4 ± 0.4	3.1 ± 0.6	0.0011

*N=30

< Table 1 >

PCP発症確率予測統計モデルの作製

- 予測(説明)変数
 A ステロイド初期投与量
 B ステロイド総投与量
 C 1ヶ月後のリンパ球数
 D 治療開始時の血清アルブミン値
 E 免疫抑制剤の有無

予測変数 (A B C D E) を有する症例の PCP発症予測確率をP(x)とする

$$\log(P(x)/(1-P(x))) = -0.731 + 0.0701x A + 0.00026x B - 0.00206x C - 1.961x D + 1.697x E$$

= nsk score (S) ①

$$P(x) = 1 / (1 + e^{-S}) \quad ②$$

< Table 2 >

PCP発症確率予測統計モデルの適合性

	予測確率低値群 P(x) < 0.5	予測確率高値群 P(x) ≥ 0.5	Total
PCP (+)	3	6	9
PCP (-)	72	1	73
Total	75	7	82

陽性予測率 (PPV) = 6 / 7 = 85.7 %
 陰性予測率 (NPV) = 72 / 75 = 96.0 %
 予測正診率 (PA) = (6 + 72) / 82 = 95.1 %

感度 = 6 / 9 = 66.7 %、特異度 = 72 / 73 = 98.6 %
 正診率 = 78/82 = 95.1 %

< Table 3 >

F 健康危険情報
なし

G 研究発表

1 論文発表

投稿中である

2 学会発表

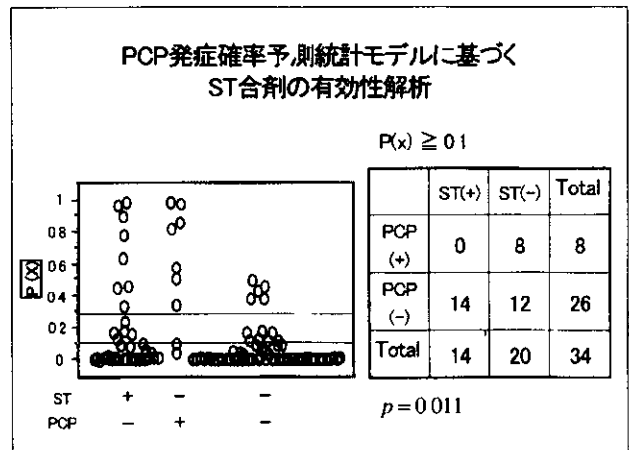
1) 小川 純 ほか 膠原病患者に対する免疫抑制療法下におけるカリニ肺炎の合併に関する臨床的検討 第47回日本リウマチ学会、2003年

H 知的財産権の出願 登録
なし

**PCP発症予測統計モデルにおける
予測変数のodds ratio (OR)**

予測変数	増加分	OR	95%CI
ス剤 初期投与量	10mg	2.02	1.04-3.92
ス剤総投与量	1000mg	1.30	0.93-1.80
1ヶ月後 リンパ球数	100/ μ l	0.81	0.60-1.20
血清 アルブミン	0.5mg/dl	0.38	0.01-1.22
免疫抑制剤	無/有	5.46	0.81-45.63

< Table 4 >



< Table 5 >

10. ANCA関連血管炎の免疫抑制療法下カリニ肺炎の診断、ST合剤予防、 標的治療の指標としての抗 β —グルカン抗体の有用性

分担研究者 吉田 雅治 (東京医科大学八王子医療センター 腎臓科 助教授)
研究協力者 大野 尚仁 (東京薬科大学薬学部 免疫学教室 教授)
石橋 健一 (東京薬科大学薬学部 免疫学教室 大学院)

研究要旨

ANCA関連血管炎 (AAV) に対する免疫抑制療法中の重篤な合併症であるカリニ肺炎 (PCP) の予知、ST合剤の予防、標的治療の予後予測の指標として β クルカン (BG) に対する抗体 (抗BG抗体) の意義について明らかにする事を目的とした。真菌及びPCの細胞壁に存在する β クルカン (BG) を抗原とした特異的抗体 (抗BG抗体) を、ELISAにより樹立し、健常人22名、AAV52名 (PCP3名を含む) を測定した。抗BG抗体は健常人22名が 2677 ± 1686 Uに比較し、未治療期AAV16名は 691 ± 522 U、治療後AAV24名は 547 ± 416 Uと有意に低値を示した ($P < 0.01$)。抗BG抗体を経時的に測定するとAAV寛解期11例は 1180 ± 1304 Uと上昇するのに比較し、PCP併発時にはBGの上昇に加え抗BG抗体は 369 ± 441 Uと有意に低下し ($P < 0.01$)、抗菌療法によりPCPが回復すると抗BG抗体は速やかに上昇した。PCP2例のBAL中の抗BG抗体を発症時より経時的に測定すると血清中と鏡面的に推移した。マウスによる検討により抗BG抗体はBGに対する中和抗体として作用すると考えられた。AAVに対する免疫抑制療法中ST合剤はPCPの予防、標的治療として有効であり、その際BGは γ クロフリン療法及び透析治療の透析膜使用で偽陽性を呈する事があるが、抗BG抗体はそれらの影響を受けなかった。AAVのPCP感染の予知、予測の指標として抗BG抗体は臨床上有用と考えられた。

A 研究目的

ANCA関連血管炎 (AAV) は、副腎皮質ステロイド剤、免疫抑制剤を主体とする免疫抑制療法により寛解へ導入される症例がある一方、深在性真菌症およびカリニ肺炎 (PCP) の感染症死が最も多く早期診断を含めた対策の確立が急務である^{1) 2) 3)}。最近植物、食物など自然界及び真菌及びカリニ原虫の細胞壁に広く存在し、特異的免疫応答が注目されている細胞壁 β クルカン⁴⁾に

対する抗体産生について検討した。一般に、 β クルカンは免疫原性が低いと考えられており、これに対する抗体産生については十分に検討されていない。そこで、今回可溶化したカンシタ細胞壁 β クルカンを抗原⁵⁾とした抗体 (抗CSBG抗体) の測定系を酵素抗体法 (ELISA) により樹立し、AAVのカリニ肺炎 (PCP) 感染症の早期診断を含めた対策における指標としての臨床的意義について検討した。

B 研究方法

1 CSBGの調整

Candida albicans IFO1385のアセトン乾燥菌体を次亜塩素酸ナトリウム (Na Clo) で処理し、引き続きDMSO抽出してCSBGを調整し、これをNaHCO³ (PH8.2) で適宜希釈して使用した。

2 抗CSBG抗体価の測定

CSBG (25ug/ml) を可溶性抗原として用い、一次抗体には検体を、二次抗体としてペルオキナーゼ標識抗ヒトIgG,IgMを、発色試薬にはTMBを用い、450nmの吸光度により抗CSBG抗体価を比色定量した (ELISA)。

3 抗CSBG標準抗体精製

健常人血清 (ポリクロヒンN) から粒子状 β クルカン、OX-CA担体を用い調整した。

4 抗CSBG抗体測定対象患者

健常人22名、AAV52名を対象とした。

C 研究結果

1 抗CSBG抗体測定系の樹立 (ELISA)

図1に示すように精製CSBG25mg/mLを固相化し、BSAでblocking処理したELISAにて抗CSBG抗体を測定した。健常者の血清およびポリクロヒンNを用いて各希釈率は12800倍以上と非常に高感度で抗CSBG抗体を検出され、定量的に測定できることが明らかとなった。抗CSBG抗体は、 β クルカンの高次構造依存的反応性を示し、直鎖 β -1,6構造に対して高い反応性を示した。

2 抗CSBG抗体に β クルカンを添加した競合的ELISA測定 (交差反応性の検証)

精製CSBG 250ug/mLを固相化したELISAに、CSBGを競合剤として添加し、結合阻害を測定した。CSBGの添加により用量依存的に、結合がほぼ100%と特異的に抑制された。

3 各種疾患血清における抗CSBG抗体価

図2に抗CSBG抗体を健常人22名とAAVの

患者52名についてELISAにより測定した結果を示す。抗CSBG抗体価は健常人22名が2677 \pm 1686Uに比較し、未治療活動期AAV14例は691 \pm 522U、免疫抑制治療後AAV24名は547 \pm 416Uと健常人に比較して有意に低値を示した (P<0.01)。AAVにおける抗CSBG抗体を経時的に測定すると寛解期11例は1180 \pm 1304 Uと上昇した。一方、AAV治療後PCP併発した3名の抗CSBG抗体は369 \pm 441Uと健常人に比較して有意に低下した (P<0.01)。

4 AAVにおける抗CSBG抗体の経時的測定 (症例1) KM 64歳、男性、AAV (RPGN+カリニ肺炎)

図3に臨床経過を示すか、MPO-ANCAが陽性で腎血管炎を呈した病初期は、抗CSBG抗体価は1800Uと高値であった。腎血管炎に対して副腎皮質ステロイド中等量 (32mg/日) および、エントキサソロン (100mg/日) 併用後、MPO-ANCAの低下、腎血管炎症候が軽快するに伴い、抗CSBG抗体価は600Uまで徐々に低下していった。発症1ヶ月目に、発熱、呼吸困難を示し気管支洗浄液よりカリニ原虫を証明し、カリニ肺炎による呼吸不全を併発した。CRPの上昇、 β クルカンの上昇に先行して抗CSBG力価は100Uまで低下した。ST合剤及びステロイドパルス療法の治療によりカリニ肺炎の軽快に伴い抗CSBG力価は1300Uまで上昇した。同時に測定したBAL中の抗CSBG抗体価はカリニ肺炎発症早期に5318Uと高値を示したか、軽快すると585Uまで速やかに低下した。一方、 β クルカンはカリニ肺炎発症後一端上昇すると、腎血管炎による腎不全に対するCHDF,HD治療による透析膜の影響も関与してか高値を持続する傾向を示した。

症例2) WT 56歳 男性 AAV (肺腎症候群) PCP (-)

図4に臨床経過を示すが、浮腫、乏尿に続いて、急激に血清クレアチニン (S Cr)

が29mg/dlと上昇し、MPO-ANCAが136Uと高値陽性を示し腎血管炎による急速進行性糸球体腎炎（RPGN）を呈した。CRP23mg/dlと上昇し、同時に肺血管炎（急性間質性肺炎）による呼吸困難を呈し、肺腎症候群を伴うAAVと診断した。未治療活動期に抗CSBG抗体力価は2500Uと高値を示した。副腎皮質ステロイドパルス療法を含むPSL60mg/日投与及びエントキサンプルス療法（700mg/2回）により、MPO-ANCAは10U以下と低下し、肺腎血管炎症状とも改善を示した。抗CSBG抗体力価は徐々に低下したが700Uで維持され、ST合剤（2錠/週）の予防投与を免疫抑制治療初期より行った結果、カリニ併発感染症をきたさず治療できた。一方、 β クルカンは経過中 γ クロフリン療法の投与により高値を持続し、PCP併発感染症の予知マーカーとしては不適當であつた。

5 マウスによる抗CSBG抗体の検討

DBA/2マウス（抗CSBG抗体保持）の尾静脈よりCSBGを投与し、抗CSBG抗体がどのような挙動を示すか検討した。図5に示すように、生食水に比しCSBGの添加容量依存的に投与後1-2時間の早期に抗CSBG抗体力価は有意に低下し（ $P < 0.001, 0.005$ ）、速やかに元に復した。

D 考察

AAV感染症死亡のリスク因子の一つとして、免疫抑制療法中のカリニ肺炎の早期診断が必要である^{1) 2) 3)}。最近、植物、食物、カリニ原虫含む真菌など自然界に広く存在し、特異的免疫応答が注目されている β クルカン⁴⁾に対する抗体産生に関して検討した。 β クルカンは一般に免疫原性が低いと考えられており、細胞壁 β クルカンに対する抗体産生についてはこれまで十分に検討されていない。我々はカンシタ細胞壁 β クルカン（CSBG）の可溶化方法を開発し、種々の活性を見出し報告した⁵⁾。また、

カンシタをマウスに免疫すると抗CSBG抗体価が上昇することも見出した⁶⁾。そこで、可溶化したカンシタ細胞壁 β クルカンを抗原とした抗体（抗CSBG）抗体の測定系をELISAにより樹立し、AAVのカリニ肺炎の予知および宿主の免疫能の指標としての臨床的意義について検討した。図1に示すように抗CSBG抗体の測定系をELISAにより樹立し、 β クルカン直鎖 β -1、6構造を認識し、 β クルカンの競合的抑制試験により特異的免疫反応を確認し得た⁶⁾。抗CSBG抗体力価は図2に示すように、生体内の自然免疫および獲得免疫として機能していると考えられ、健常人では平均2677Uと高かった。一方、AAVの抗CSBG抗体は健常人に比較して発症未治療活動期に平均691Uと低く、さらに免疫抑制療法後は平均547Uとさらに有意に低下した（ $P < 0.01$ ）。抗CSBG抗体をAAVにおいて経時的に測定すると、免疫抑制療法により血管炎の寛解11例は抗CSBG抗体価は1180Uまで上昇する傾向を示した。一方、AAVで免疫抑制療法中に、カリニ肺炎を併発した3例は抗CSBG抗体が369Uまで急激に低下する傾向を示した。ST合剤⁷⁾の治療によりカリニ肺炎が軽快治癒すると、抗CSBG力価は速やかに上昇した。一方、今回の検討により β クルカンは γ クロフリン療法及び透析治療の透析膜使用などで偽陽性を呈する事が明らかになった。マウスによる抗CSBG抗体の検討の結果、抗CSBG抗体は、 β クルカンの中和抗体として作用すると考えられた。AAVに対する免疫抑制療法中ST合剤はPCPの予防、標的治療として有効であり、AAVの抗CSBG抗体測定は、免疫抑制療法時の免疫能およびカリニ肺炎の予知および予後予測に有用と考えられた⁸⁾。

E 結論

AAVに対する免疫抑制療法中ST合剤はPCP予防、標的治療として有効であり、

PCPの補助診断として β グルカンか γ クロフリン療法及び透析治療の透析膜使用などで偽陽性を呈する事があるのに比較し、抗 β グルカン抗体（抗CSBG抗体）測定は、それらの影響を受けなかった。AAVのPCP感染の予知、予測の指標として抗CSBG抗体は有用で、AAVの至適免疫抑制療法、感染症対策上の臨床的指標の一つとして重要と考えられた⁸⁾。

参考文献

- 1) 吉田雅治 ANCA関連血管炎の治療 リウマチ科, 29, 249-254, 2003
- 2) 吉田雅治 免疫抑制療法に伴う感染症 リウマチ科, 29, 417-422, 2003
- 3) Jarrousse B, Guillevin L, Bindi Petal Increased risk of pneumocystis carini pneumonia in patients with Wegener's granulomatosis Clin Exp Rheumatol 11 615-621, 1993
- 4) Ohno N, Uchiyama M, Tsuzuki A et al Solubilization of yeast cell-wall β - (1-3) -D-glucan by sodium hypochlorite oxidation and dimethyl sulfoxide extraction Carbonhydrate Research 316 161-172, 1999
- 5) Tokunaka K, OhnoN, Adachi Y et al Immunopharmacological and immunotoxicological activities of a water-soluble (1-3)- β -D-glucan, CSBG from Candida spp Int J of Immunopharmacology 22 383-394, 2000
- 6) Masuzawa S Yoshida M Ishibashi K et al Solubilized Candida Cell Wall β -

Glugan, CSBG, is Epitope of Natural Human Antibody Drug Development Research58 1-11, 2003

7) Stegeman CA, Cohen Tervart, Jong Pe et al Trimethoprim - Sulfamethoxazole (Co-trimoxazole) for the prevention of rerlapses of Wegener's granulomatosis N Eng J Med 335 16-20, 1996

8) 吉田雅治 ANCA関連血管炎の免疫抑制療法下日和見感染症の早期診断, 治療における抗 β グルカン抗体の有用性 リウマチ科, 31 1-6, 2004

F 健康危険情報
特になし

G 研究発表

1 論文発表

1) 吉田雅治 ANCA関連血管炎の免疫抑制療法下日和見感染症の早期診断, 治療における抗 β グルカン抗体の有用性 リウマチ科, 31 1-6, 2004

2 学会発表

1) 吉田雅治、大野尚仁、石橋健一 免疫抑制療法下真菌感染症- β グルカンの免疫応答を中心として-第47回日本リウマチ学会総会、シンポジウム9 リウマチの重篤な合併症の早期診断と治療2003年4月24日

H 知的財産権の出願、登録状況

- 1 特許取得 申請検討中
- 2 実用新案登録 なし

11 膠原病治療中のカリニ肺炎合併例と一次予防適応基準についての検討

分担研究者 金井 美紀 (順天堂大学医学部 膠原病内科 講師)
研究協力者 田村 直人 (順天堂大学医学部 膠原病内科 講師)
戸叶 嘉明 (順天堂大学医学部 膠原病内科 非常勤講師)
李 鍾碩 (順天堂大学医学部 膠原病内科)

研究要旨

過去5年間の当科における膠原病・リウマチ治療中のカリニ肺炎13例について検討した。ステロイド大量投与、免疫抑制薬併用例が多く、死亡例は4例であった。死亡例のうち70歳以上が3例で、間質性肺炎合併が2例であった。カリニ肺炎はsulfamethoxazole trimethoprim (ST) 合剤の投与にてほぼ予防可能であるが、一次予防の問題点として、副作用や耐性菌の出現の可能性があげられる。予防投与の適応に関しては、ステロイド投与量、免疫抑制薬併用の有無、年齢、肺合併症の有無等を考慮することか必要と考えられた。

A 研究目的

カリニ肺炎は膠原病治療中に遭遇する代表的な日和見感染症であり、進行性の呼吸不全を呈する重篤な合併症である。Sulfamethoxazole trimethoprim (ST) 合剤 (ハクタ錠) によるカリニ肺炎の一次予防はHIV感染症においては具体的基準が存在するか、膠原病の免疫抑制療法時に関しては経験的に用いられているのか現状である。しかし、ST合剤には副作用や耐性菌出現の危惧があり、その反面カリニ肺炎による死亡例も存在することから、一次予防適応基準が必要と考えられる。

今回、当科における膠原病治療中のカリニ肺炎合併症例について検討し、一次予防の問題点や具体的な適応基準について考察した。

B 研究方法

過去5年間の当科における膠原病 リウ

マチ治療中のカリニ肺炎合併例について性別、年齢、基礎疾患、罹患年数、治療内容、肺合併症の有無、一次予防の有無および転帰などについて検討した。

C 研究結果

症例は13例で男性4例・女性9例、基礎疾患は全身性エリテマトーテス 4例、多発性筋炎 3例、関節リウマチ2例、混合性結合組織病、成人Still病、顕微鏡的多発血管炎、リウマチ性多発筋痛症が各1例であり、間質性肺炎合併例が2例、あった。年齢は17歳から87歳で、65歳以上が5例であった。プレトニソロン換算で1mg/kg/day以上の投与例が8例で、8例で免疫抑制薬が併用されていた。その内訳はシクロフォスファミド静注4例 経口1例、シクロスポリン2例、メトトレキサート1例であった。発症時のリンパ球数は、11例で1,000/ml以下であった。一次予防は2例で施行されており、1例

はペンタミシン吸入、もう1例は透析中のためST合剤1Tを週1回のみ投与されていた。2例でサイトメガロウイルス肺炎の合併を認めた。カリニ肺炎による死亡は4例で、年齢は50歳か1例、70歳以上が3例で基礎疾患は様々であった。4例中3例で免疫抑制薬が投与されており、間質性肺炎合併例か2例でいずれもシクロスポリン投与例であった。

D 考察

膠原病の免疫抑制療法中のカリニ肺炎は、重篤な合併症のひとつである。ST合剤の予防投与によりほぼ発症を抑制できるか、問題点として、ST合剤の副作用や耐性菌の出現、コストの問題があげられる。カリニ肺炎の早期診断・治療が重要であるのはいままでもないか、一点は高齢者や間質性肺炎合併例などカリニ肺炎が致死的になる可能性の強い症例では予防投与が必要であること、もう一点は今回の症例中3例が転院例で予防投与されておらずカリニ肺炎を発症していたことから、ステロイド大量投与で免疫抑制薬併用例など明らかに日和見感染のリスクが高いと考えられる症例で予防投与が必要である、という観点からも予防投与の基準は必要と考えられ、以下の案を提示した。

PSL 12mg/kg/day以上、PSL 08mg/kg/day以上で65歳以上、PSL 10mg/kg/day以上で免疫抑制薬併用、間質性肺炎がありPSL

10mg/kg/day以上、間質性肺炎がありPSL 05mg/kg/day以上で免疫抑制薬を併用、間質性肺炎がありPSL 05mg/kg/day以上で65歳以上、のいずれかに当てはまる場合はハクタ錠2錠を週2-3回継続投与する。

今後はこの案の有用性につき検討していく予定である。

E 結論

膠原病治療中のカリニ肺炎の一次予防投与の適応に関しては、ステロイド投与量、免疫抑制薬併用の有無、年齢、肺合併症の有無等を考慮することか必要と考えられた。

F 健康危険情報

特になし

G 研究発表

1 論文発表

特になし

2 学会発表

特になし

H 知的財産権の出願 登録状況(予定含む)

1 特許取得

特になし

2 実用新案登録

特になし

3 その他

特になし

12. 全身性エリテマトーデスにおけるCD40リガンド(CD40L)に対する自己抗体の臨床的意義

分担研究者 鏑木 淳一 (東京電力病院内科 科長)
研究協力者 桑名 正隆 (慶應義塾大学医学部 先端医科学研究所 講師)
中村 真弓 (慶應義塾大学医学部 大学生)

研究要旨

活性化T細胞や血小板に一過性に発現されるCD40Lに対する自己抗体を検索し、全身性エリテマトーデス (SLE) におけるその臨床的意義を追究した。リコンビナントCD40Lを固相化した酵素免疫測定法により、SLE 132例中7例 (5%)、原発性抗リン脂質抗体症候群 (PAPS) 24例中3例 (13%)、特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) 90例中10例 (11%) にIgG抗CD40L抗体が検出された。抗CD40L抗体陽性SLEは陰性例に比べて血小板減少症、溶血性貧血、抗SSA抗体の頻度か有意に高かったが、血栓症との関連はなかった。患者血清中の抗CD40L抗体の固相化CD40Lとの結合は抗CD40Lモノクローナル抗体により競合的に阻害され、CD40L上に少なくとも3つのエピトープの存在が推測された。以上の成績より、抗CD40L自己抗体は活性化血小板膜上への結合を介して、血小板クリアランス亢進を誘導する可能性が考えられた。

A 研究目的

CD40リガンド (CD40L) はTNFファミリーに属する膜貫通型糖蛋白で、生体内におけるその発現はごく一部の細胞に限られる。CD4⁺T細胞の多くは抗原認識により活性化されるとCD40Lを一過性に発現する。CD40Lは血小板の細胞質にも存在し、トロンヒンなどのアコニスト刺激により数分のうちに膜表面へと移動する。CD40Lの主な受容体はTNF受容体ファミリーのCD40で、B細胞、樹状細胞など抗原提示細胞上に恒常的に発現されるか、血管内皮細胞、血小板なども活性化によりCD40を発現する。CD40Lは単分子ではCD40と結合せず、二量体となって同様に三量体を形成したCD40と結合して両方向性のシグナル

を伝える。獲得免疫におけるCD40/CD40Lシグナルの重要性から、自己免疫疾患や拒絶反応に対する抗CD40L抗体によるシグナル阻害療法の有効性が検討されている。全身性エリテマトーデス (SLE) や特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) を対象とした臨床試験である程度の臨床効果が得られたが、予想外の副作用として血栓塞栓症がみられ、試験中断を余儀なくされている。

SLEをはじめとした膠原病では後天性の血栓素因がみられ、その多くは抗リン脂質抗体が関連する。しかし、病態が明らかでない血栓症も時に見られ、それらかCD40Lに対する自己抗体で説明しうる可能性を考えた。その点を検証するため、SLE、ITP、原発性抗リン脂質抗体症候群 (PAPS) 患

者を対象として抗CD40L抗体を検出し、その臨床的意義を追究した。

B 研究方法

1 対象

アメリカリウマチ学会 (ACR) の分類予備基準を満たすSLE患者125例、Sapporo基準を満たすPAPS24例、ITP90例を対象とした。SLE125例中27例が動静脈血栓症、27例が流産または子宮内胎児死亡、23例が遷延する血小板減少症を有していた。対照として健常人62例を用いた。

2 抗CD40L抗体の検出

CD40Lの細胞外ドメインをコートするリコンヒナント三量体(PeproTech, London, UK)を抗原とした酵素免疫測定法(ELISA)によりIgG抗CD40L抗体を測定した。得られた吸光度の結果は、抗CD40Lヒト化抗体IDEC-131/E6040の希釈系列を用いた標準曲線によりユニット化した。健常人62例の測定結果から求めた平均値に標準偏差の5倍を加えた375 unitをカットオフとした。ELISAの特異性は、ヒトCD40L遺伝子を導入したHeLa細胞および野生型HeLa細胞由来の細胞膜分画を用いた競合阻害により確認した。さらに、CD40L遺伝子導入HeLa細胞および野生型HeLa細胞を用いたフローサイトメトリーにより患者血清中の自己抗体の膜結合CD40Lに対する反応性を検討した。

自己抗体により認識されるCD40L上のエピトープを調べるため、患者血清中の自己抗体の固相化CD40Lへの結合に対する競合阻害効果を2種類のマウス抗CD40Lモノクローナル抗体 (TRAP1、24-31) とヤキ抗CD40Lポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) を用いて検討した。

3 統計学的解析

2群間の頻度および平均値は、それぞれchi-square test、Student t-testを用いて比較した。

C 研究結果

抗CD40L抗体はSLE7例 (6%)、PAPS3例 (13%)、ITP11例 (12%) に検出されたが、健常人で陽性となる血清はなかった (図1)。抗CD40L抗体陽性5血清をCD40L遺伝子導入および野生型HeLa細胞の細胞膜分画と反応させた後にELISAに用いた。すべての血清の固相化CD40Lに対する結合はCD40L遺伝子導入細胞の細胞膜との前処理により選択的に抑制された。また、抗CD40L抗体陽性3血清より精製したIgG分画はフローサイトメトリーでCD40L遺伝子導入HeLa細胞に結合したか、野生型HeLa細胞には結合しなかった。以上の結果から、CD40Lに対する自己抗体がSLE、PAPS、ITP患者血清中に存在すること明らかにされた。

抗CD40L抗体が陽性となった計21例の患者のうち動静脈血栓症がみられたのはわずか2例 (10%) で、流産がみられたのも3例 (14%) であった。一方、21例中20例 (95%) で遷延する血小板減少がみられた。抗CD40L抗体陽性例の約半数がITPであったことから、SLEを対象をしばって抗CD40L抗体陽性7例と陰性118例で臨床症状を比較した (表1)。その結果、抗CD40L抗体と関

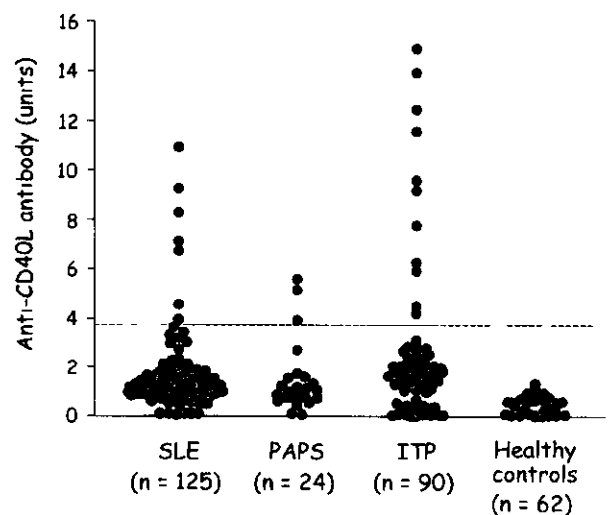


図1 SLE、PAPS、ITP、健常人における抗CD40L抗体の測定

表1 SLEにおける抗CD40L抗体の有無による臨床症状の比較

Clinical findings	Antri-CD40L(+) (n = 7)	Antri-CD40L(-) (n = 118)	P
Female%	100	90	NS
Age at examination years	37.9 ± 12.7	41.6 ± 13.2	NS
Thromboembolism %	14	22	NS
Spontaneous abortion %	20 (1/5)	8 (5/64)	NS
Malar rash %	71	59	NS
Discoid rash %	14	9	NS
Photosensitivity %	43	34	NS
Oral ulcers %	14	27	NS
Arthritis %	71	66	NS
Serositis %	14	20	NS
Renal disorder %	14	36	NS
Neurologic disorder %	29	6	NS
Hemolytic anemia %	29	3	0.02
Leukopenia %	57	60	NS
Thrombocytopenia %	100	14	<0.00001
Anti-Sm antibodies %	29	12	NS
Anti-SSA/Ro antibodies %	86	31	0.01
Anti dsDNA antibodies units	93 ± 99	55 ± 81	NS

NS = not significant

連する臨床症状として溶血性貧血、血小板減少、抗SS-A/Ro抗体が抽出された。抗CD40L抗体陽性SLE患者にみられた血小板減少は、いずれもGPIIb/IIIaに対する抗血小板抗体が陽性で骨髄巨核球の減少がなく、免疫性の機序によると考えられた。

3種類の抗CD40L抗体を用いた競合阻害実験では、患者血清中の抗原認識様式の多様性が明らかとなった。すなわち、検討した9血清のうち24-31のみで阻害される血清が4、TRAP1のみで阻害される血清が1、TRAP1とヤキポリクローナル抗体で阻害される血清が4あり、少なくとも3つの異なるエピトープの存在が考えられた。

D 考案

CD40Lに対する自己抗体はSLE、PAPS、ITP患者血清中に検出され、血小板減少と強く関連した。患者血清中の抗CD40L抗体は膜表面上に発現されたCD40L三量体を認識するか、免疫フロットによる変性したCD40L単量体とは結合しないことから、三量体により形成された高次構造を認識する。生体内でCD40Lを発現する細胞は非常に少ないことから、抗原に結合しない状態で流血中に存在すると考えられる。今回検

出された自己抗体はIgG型で、これまでの検討ではIgM型の自己抗体は検出されていない。CD40Lを遺伝的に欠損するマウスあるいは患者はアイソタイプスイッチが起こらず、IgGとIgA低値およびIgM高値を呈する（抗IgM血症）。したがって、患者血清中に見出された自己抗体が活性化T細胞に発現されたCD40Lと抗原提示細胞のCD40のシグナルを阻害する可能性は低いと考えられる。今後、自己抗体がCD40-CD40Lの結合による細胞内シグナルを抑制しえるかを検討する予定である。

抗CD40Lヒト化抗体の臨床試験における血栓塞栓症の発症から抗CD40L自己抗体と血栓素因との関連を想定したが、今回の検討では血栓症との関連は見出されなかった。血小板はCD40を恒常的に発現しており、アコニスト刺激によりCD40Lを膜上に発現する。血管内に機械的損傷や炎症がおこると、血管内皮細胞上のCD40と活性化血小板に発現されたCD40Lが結合し、血管内皮細胞における炎症性サイトカイン、接着分子、組織因子の発現を介して、炎症、凝固機転が促進する。一方、CD40Lの第二の受容体として同定された血小板膜糖蛋白GPIIb/IIIaが活性化血小板膜上のCD40Lと結合することで動脈血栓の安定性に寄与する。したがって、血小板に発現されたCD40Lは血管内皮における炎症、過凝固状態を惹起したあと、器質化血栓を形成することで自ら一連の反応を収束すると考えられている。これら一連のプロセスに対してCD40Lに対する抗体が及ぼす影響は単純ではない。活性化血小板上のCD40LとGPIIb/IIIaの結合が阻害されれば、血小板血栓が不安定となって血栓症が誘発されることは容易に想像できる。ただし、抗CD40L抗体は血小板上のCD40Lと血管内皮細胞や血小板上のCD40との結合も阻害し、血管内での炎症反応や血栓形成を抑制する可能性もある。患者血清中の自己抗体は活