

関節リウマチ患者滑膜組織における TNF レセプター分子発現とその制御機構の解明に関する研究

分担研究者 井田弘明 長崎大学 医学部・歯学部附属病院 第一内科 助手

研究要旨 関節リウマチ(RA)患者に生物製剤を使用すべきか、いつやめるべきか、などの治療方針を決定するための基礎実験として、まだ詳細に検討されていない RA 滑膜組織における TNF レセプター分子発現を検討した。人工関節置換術で得られた RA 患者の滑膜組織をコラゲナーゼ処理直後と継代培養後に CD45 分子、CD14 分子に対する抗体を使用して三重染色を行い、TNF レセプター分子発現をフローサイトメーターで検討した。コラゲナーゼ処理直後に分離された滑膜細胞において、A 型滑膜細胞(CD45+CD14+)は、TNFRII 分子発現が強く、TNFRI 分子発現は弱かった。B 型滑膜細胞(CD45-CD14-)は、TNFRI 分子発現が強く TNFRII 分子発現はほとんどみられなかった。継代培養後は、ほとんどが B 型滑膜細胞となり、TNFRI 分子の発現低下がみられた。以上の結果から、継代培養の滑膜細胞における TNF レセプター分子発現は、分離直後の発現と異なっている可能性が示唆され、今後、患者の生体内の状態を反映している分離直後の滑膜細胞を使用した研究が必要と思われた。

A. 研究目的

高額な生物製剤を多くの関節リウマチ(RA)患者に使用することは、経済危機に直面した本邦において不可能であり、適応に関しては何らかの線引きが必要である。しかも、その適応は、ある程度科学的根拠に基づいたものでなければならない。その見地から、RA 患者に生物製剤を使用すべきか、いつやめるべきか、などの治療方針を決定するための基礎実験として、まだ詳細に検討されていない RA 滑膜組織における TNF レセプター分子発現を検討する必要がある。今回、継代培養の滑膜細胞における TNF レセプター分子発現が、実際の生体内の発現と違いがあるか検討した。

B. 研究方法

人工関節置換術で得られた RA 患者の滑膜組織をコラゲナーゼ処理直後と継代培養

後に CD45 分子、CD14 分子に対する抗体を使用して三重染色を行い、TNF レセプター分子発現をフローサイトメーターで検討した。

(倫理面への配慮)

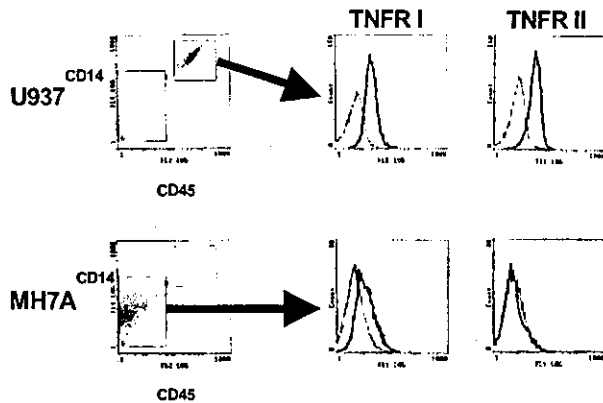
培養滑膜線維芽細胞は文書で同意が取得されている手術症例から単離培養し、個人情報情報は匿名化により保護されている。

C. 研究結果

1) TNFRI 分子と TNFRII 分子に対するモノクローナル抗体の染色性が良好なことを U937 細胞を使用して確かめた。U937 細胞は、CD45+CD14+の領域に、MH7A 細胞(キッセイ宮澤先生から供与; 理研細胞バンク)は、CD45-CD14-の領域に染色された(図1)。

(図1)。

図1



2) コラゲナーゼ処理直後に分離された人工関節置換術由来滑膜細胞 (図2)、および滑膜切除術由来滑膜細胞 (図3) において、A 型滑膜細胞(CD45+CD14+)は、TNFR II 分子発現が強く、TNFR I 分子発現は弱かった。B 型滑膜細胞(CD45-CD14-)は、TNFR I 分子発現が強く TNFR II 分子発現はほとんどみられなかった。継代培養後は、ほとんどが B 型滑膜細胞となり、TNFR I 分子発現の低下がみられた。

図2

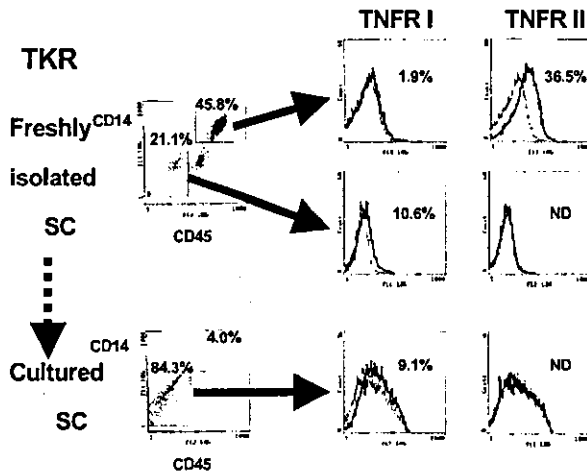
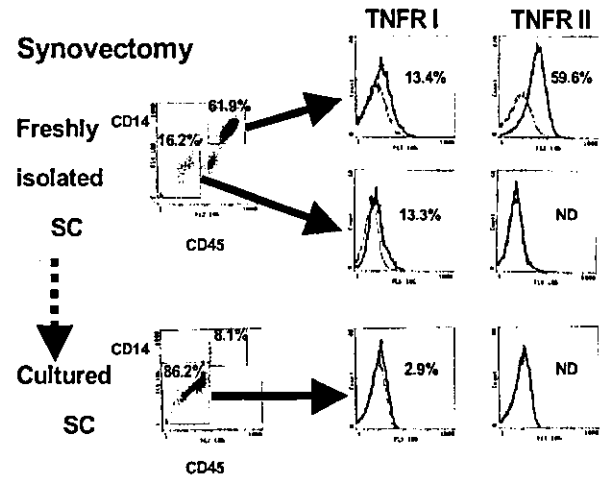


図3



D. 考察

RA 滑膜組織における TNF レセプター分子発現は、検出方法で異なる可能性がある。コラゲナーゼ処理直後と継代培養後とで、RA 滑膜細胞の種類・構成比率が異なることは知られていたが、今回の検討から、TNF レセプター分子発現様式も異なっていた。特に TNFR I 分子は、多くがゴルジ体にプールされており、免疫組織染色やウエスタンブロット法による蛋白同定では、実際の細胞表面上の発現と異なる結果がでる可能性がある。生体内での TNF- TNF レセプター分子間相互作用を検討するためには、TNF レセプター分子の実際の細胞表面上の発現を知る必要がある。今後、分離直後の滑膜細胞上の TNF レセプター分子が、刺激によってどのように変化するか、フローサイトメーターで検討するとともに、刺激によって shedding を生じるか、培養液中の可溶性 TNF レセプター分子を ELISA 法で測定して検討したい。

E. 結論

継代培養の滑膜細胞における TNF レセプター分子発現は、分離直後の発現と異なっ

ている可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

・Ida H(筆頭著者、他13名): A novel mutation (T61I) in the gene encoding tumour necrosis factor receptor superfamily 1A (TNFRSF1A) in a Japanese patient with tumour necrosis factor receptor-associated periodic syndrome (TRAPS) associated with systemic lupus erythematosus.

Rheumatology (Oxford) 43: 1292-9, 2004

・Kawakami A, Ida H(9番目、他13名): Anti-apoptogenic function of TGFβ1 for human synovial cells: TGFβ1 protects cultured synovial cells from mitochondrial perturbation induced by several apoptogenic stimuli. Ann

Rheum Dis 63; 95-7, 2004

・Migita K, Ida H(7番目、他9名): Suppressive effect of leflunomide metabolite (A77 1726) on metalloproteinase production in IL-1β stimulated rheumatoid synovial fibroblasts. Clin Exp Immunol 137: 612-6, 2004

・Miyashita T, Ida H(8番目、他10名): Osteoprotegerin (OPG) acts as an endogenous decoy receptor in tumour necrosis factor-related

apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis of fibroblast-like synovial cells. Clin Exp Immunol 137: 430-6, 2004

・Tanaka F, Ida H(5番目、他5名): Interleukin-18 induces serum amyloid A (SAA) protein production from rheumatoid synovial fibroblasts. Life Sci 74: 1671-9, 2004

・Yamasaki S, Ida H(6番目、他7名): Cytokines regulate fibroblast-like synovial cell differentiation to adipocyte-like cells. Rheumatology (Oxford) 43: 448-52, 2004

2. 学会発表

・井田弘明(筆頭著者、他13名)本邦初の TNF receptor-associated periodic syndrome (TRAPS) 家系の遺伝子解析(第2報) 第48回日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 p178, 2004.

H. 知的財産権の出願・登録

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

関節リウマチの簡便な活動性評価法の考案と有用性の検証に関する研究

分担研究者 亀田秀人 埼玉医科大学総合医療センター 第2内科 講師

研究要旨 生物学的製剤の適正使用に不可欠な、関節破壊を高精度で予測可能で、簡便な包括的活動性指標を試案した。これは関節腫脹に grade をつけて評価する腫脹関節スコアを中心に、患者全般評価と血清 CRP 値の計 3 項目の単純総和より求めるものである。従来の活動性評価法と高い相関を示し、infliximab 治療による改善も従来法に劣らず、有用な評価法であると考えられた。

A. 研究目的

関節リウマチ (RA) 患者に生物学的製剤を用いる最大の理由は関節破壊を阻止するためである。そこで、生物学的製剤の投与の適応や投与後の効果などを適切に判定するためには、関節破壊の進行と密接に関連した疾患活動性の評価を行うことが必須である。しかも、生物学的製剤が臨床治験としてごく限られた患者に用いられていたこれまでとは大きく異なり、今後は数人に一人の RA 患者が生物学的製剤による治療を受けることになると考えられる。

従来の生物学的製剤の臨床評価は ACR コアセットを用いた ACR 反応率や ACR-N、またはそのうちの 4 項目を用いた DAS28 (disease activity score with 28 joints) で評価されてきた。しかしながら、ACR コアセットは項目数が多く、DAS は平方根や対数の計算を要するため、全国のあらゆる施設で、生物学的製剤を投与される全ての RA 患者の活動性評価法としては不適切である。

こうした背景から Smolen らは simplified disease activity index (SDAI) を提唱したが、評価項目が 5 つと多く、DAS28 に対する優位性が少ないことからほとんど普及していない。

そこで、包括的な活動性評価法でありながら、迅速かつ簡便に行え、しかも関節破壊の進行を従来の活動性評価法より高い精度で予測しうるものを導入ことが

急務であると考え、本研究を行った。

B. 研究方法

まず、従来の活動性評価項目相互の関連性を検討し、重複なく独立性の高い評価項目を抽出した。次に国内外の文献において関節破壊の進行と関連が高いとされる評価項目を特に重視し、関節腫脹を単純な有無のみで評価した腫脹関節数ではなく、腫脹の程度を次の3段階に区別して評価した。Grade 1: 視診で明らかでないが触診で確認出来る、Grade 2: 視診で明らかで、緊満なし、Grade 3: 緊満した腫脹。これに基づいて40関節 (両側の肩、肘、手、MCP、IP/PIP、膝、足、MTP) の腫脹の程度を評価した腫脹関節スコア (SJS) を医師の側の活動性評価項目 (0-120) とした。患者評価項目としては全般的身体 (活動性) 評価 (PGA; 0-100 mmのVAS) を選択、検査項目としては赤沈値よりも関節破壊との関連が強いとされる血清CRP値 (mg/L) を採用した。

この3項目のスコアの単純な総和 Handy rheumatoid activity score with 40 joints (HRAS40) の妥当性を検討するため、当科でinfliximabを投与され14週以上経過観察されたRA患者のうち、副作用による早期脱落4例を除いた44例を対象として、DAS28やSDAIとの比較を行った。包括的活動性の相関は各患者でinfliximab投与前、投与2週後、6週後、14週後の4ポイントにおいて評価した176データから求めた。包括的活動性の経時変化はinfliximab

投与22週後のデータ（これのみ34例）まで示した。

(倫理面への配慮)

本研究は通常の診療における工夫であり、倫理面での問題は無い。

C. 研究結果

Infliximabによる治療開始前のHRAS40の各項目は、PGA 4-100、平均59.1、SJS 6-70、平均33.6、CRP (mg/L) 7-136、平均40.0と患者評価、医師評価、検査データの3者が近い分布を示した(図1)。圧痛関節数(TJC)や腫脹関節数(SJC)といった従来の評価項目に比して、SJSは高い改善率を認めた。また、CRPが2週後に最低値と最も迅速な治療反応を示し、医師の全般的活動性評価(PbGA)の改善はCRPより遅く、関節所見の改善より早いことが分かった。PGAの改善が最も遅延していた。

次に、包括的評価を比較してみると、HRAS40はDAS28と相関係数0.847、SDAIと相関係数0.820と高い相関を示した(図2)。また経時変化においてもHRAS40はDAS28やSDAIと同様にinfliximab投与2週後に有意な改善を示し、22週後まで改善が持続していた(図3)。

D. 考察

本研究では生物学的製剤の適応や治療効果の判定に有用で、関節破壊と密接に関連し、かつ簡便で迅速に全てのRA患者に適用可能な包括的活動性評価を考案した。評価項目を出来るだけ独立性の高いもののみとするために、患者評価、医師評価、検査所見に分けた。患者評価としては全般的活動性評価が全般的疼痛評価とQOLの両者を勘案した評価になると考え採用した。医師評価では圧痛関節数は患者評価の側面が半分あることから除外、医師の全般的評価は関節所見と検査所見の総合的勘案であることから除外した。腫脹関節数では関節腫脹の程度の改善が評価されず、高度な腫脹と軽度の腫脹が同程度に関節破壊に影響を及ぼすかどうかの検討もできないことから、腫脹関節スコアを考案した。視診と触診でgradeをつけることで、関節の

大きさによらない評価を可能とした。検査成績としては骨破壊との関連が高いとされることから、赤沈値ではなく血清CRP値を採用した。

これらの3評価項目がほぼ同等に寄与するよう考慮して、新しい包括的活動性評価法HRAS40を試案するにあたり、評価関節の選択を次に行った。ACRコアセットの68関節は日常診療には多過ぎるが、DAS28の28関節では関節破壊の標準的X線評価法であるvdH-modified Sharp scoreにおける評価部位との整合性が不十分であることから、まずMTP関節を加え、臨床的見地から第1趾IP関節ではなく足関節を加えた。

HRAS40のスコアはDAS28やSDAIのスコアと高い相関を示した。治療後の改善が他の指標より幾分速やかであったことは、患者評価よりも相対的に客観的評価の占める割合が大きいことと関連すると考えられ、それゆえに関節破壊をより高い精度で予測しうるかが来年度以降の重要な検討課題である。

E. 結論

生物学的製剤の適正使用に不可欠な、関節破壊を高精度で予測可能で、簡便な包括的活動性指標を試案した。これは関節腫脹にgradeをつけて評価する腫脹関節スコアを中心に、患者全般評価と血清CRP値の計3項目の単純総和より求めるものである。従来の活動性評価法と高い相関を示し、infliximab治療による改善も従来法に劣らず、有用な評価法であると考えられた。

F. 健康危険情報

特に無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

・長澤逸人, 亀田秀人, 天野宏一, 竹内勲: 関節リウマチ患者における血清マトリックスメタロプロテイナーゼ-3 (MMP-3) の臨床的意義. 炎症・再生 25:60-64, 2005.

・Kameda H, Amano K, Sekiguchi N, Takei H, Ogawa

H, Nagasawa H, Takeuchi T: Factors predicting the response to low-dose methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis: a better response in male patients. *Mod Rheumatol* 14:442-446,2004.

・亀田秀人, 竹内勤: TNF を標的とした慢性炎症性疾患の治療—抗 TNF 生物製剤による関節リウマチの寛解導入. *医学のあゆみ* 208(5):336-342, 2004.

・亀田秀人: メシル酸イマチニブの滑膜増殖抑制作用. *臨床免疫* 42(5):523-527, 2004.

2. 学会発表

・Kameda H, Ishigami H, Abe T, Takeuchi T: Expression of adapter proteins in rheumatoid synovial fibroblast-like cells and their involvements in signaling from growth factor receptors. 第 5 回欧州リウマチ会議, 2004 年 6 月.

・Kameda H, Ishigami H, Abe T, Takeuchi T. Blockade of signaling from growth factor receptors by STI571 inhibits both anchorage-dependent and -independent growth of rheumatoid synovial fibroblast-like cells. 第 68 回米国リウマチ学会, 2004 年 10 月.

・亀田秀人, 石上浩庸, 安倍達, 竹内勤: 関節リウマチの滑膜細胞におけるアダプター蛋白の発現とチロシンキナーゼ阻害薬による増殖制御. 第 48 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2004 年 4 月.

・長澤逸人, 亀田秀人, 関口直哉, 武井博文, 小川祥江, 津坂憲政, 天野宏一, 竹内勤: 関節リウマチ (RA) 患者の QOL と血清学的活動性指標との関連. 第 48 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2004 年 4 月.

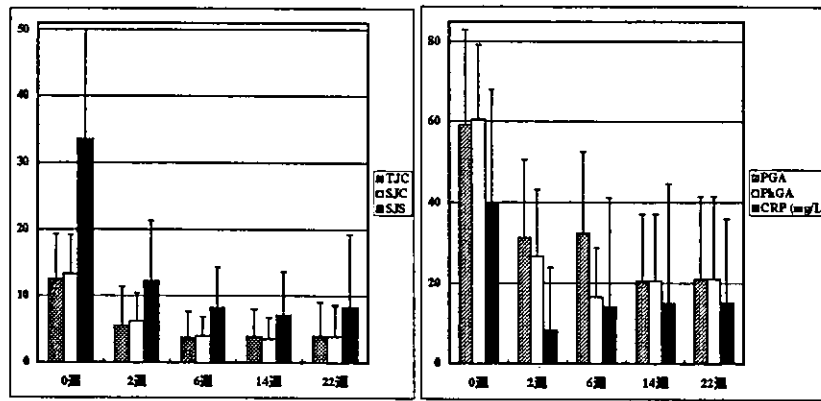
・関口直哉, 亀田秀人, 根本朋恵, 武井博文, 飯

塚篤, 小川祥江, 長澤逸人, 津坂憲政, 天野宏一, 竹内勤: 関節リウマチ患者におけるブシラミンの有用性の検討. 第 48 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2004 年 4 月.

・関口直哉, 根本朋恵, 武井博文, 小川祥江, 鈴木勝也, 長澤逸人, 亀田秀人, 津坂憲政, 天野宏一, 竹内勤: 関節リウマチにおける infliximab の臨床効果—教室自験例 40 例の検討—. 第 32 回日本臨床免疫学会総会, 2004 年 10 月.

H 知的財産権の出願・登録
無し

図1. 活動性評価項目のinfliximab投与後経時変化



全ての項目で0週と比較して2週以降有意に改善 (p<0.001)

図2. 各包括的活動性指数の相関

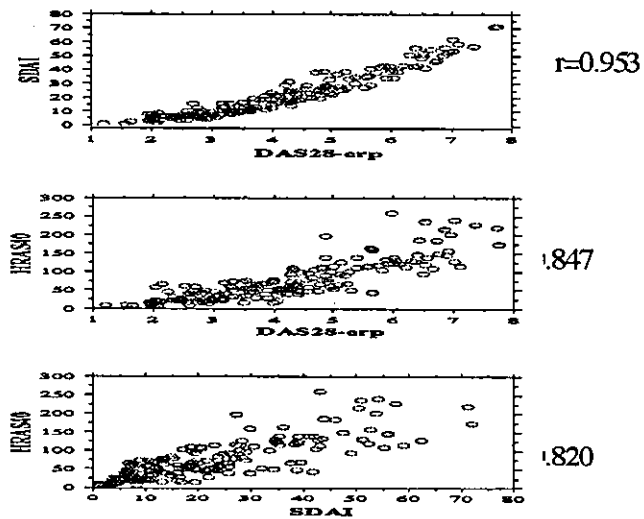
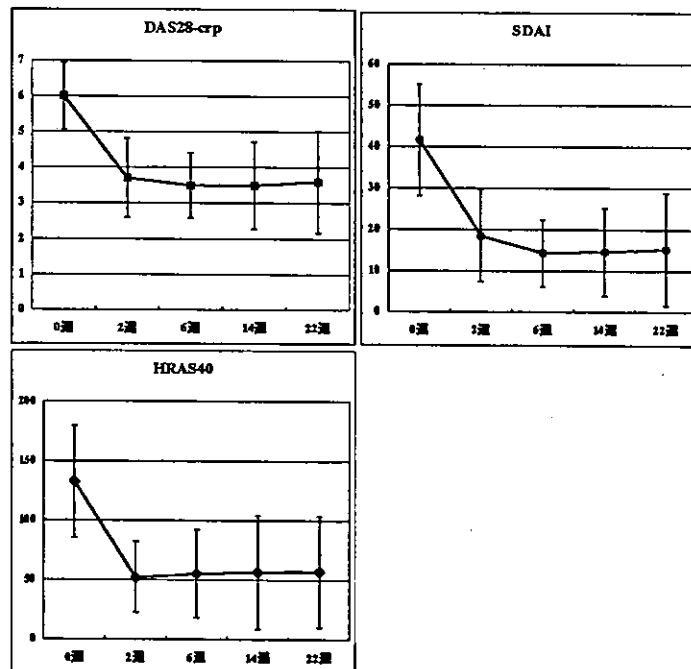


図3. 包括的活動性指数の経時変化の比較



全ての評価法で0週と比較して2週以降有意に改善 (p<0.001)

分担研究報告書

関節リウマチに対する生物学的製剤治療の免疫系への影響の解析
—結核症発症との関連から—

分担研究者 石ヶ坪良明
(横浜市立大学大学院医学研究科 病態免疫制御内科)
共同研究者 三浦健次、高林真紀、岩崎美佳、岳野光洋
(横浜市立大学大学院医学研究科 病態免疫制御内科)

生物学的製剤治療の副作用として結核症が懸念されている。本研究では本剤導入前の RA 合併結核症の自験例 12 例の臨床的特徴について解析した。RA に対してステロイド(10 例)、MTX (4 例)投与中で、全例肺病変を有し、肺外病変は粟粒結核 2 例を含み 3 例に見られた。抗結核薬の不耐用、効果不十分等の要因で RA、結核ともに治療に苦慮し、死亡例が 1 例認められた。ツベルクリン反応（ツ反）施行例は 3 例のみで、その診断的有用性は不明であった。次に、ELISPOT 法を用い、結核特異抗原（PPD、ESAT-6）を用いて、刺激末梢血単核細胞の IFN- γ 産生能を評価する免疫学的診断法の有用性について検討した。PPD に対しては結核患者のみならず、BCG 接種によるツ反陽性健常者でも特異的な IFN- γ 産生が検出された。ESAT-6 に対する反応性は軽度であるが、結核患者で特異的に検出された。RA 患者は、生物学的製剤をはじめ免疫抑制状態という特殊な免疫環境下にあるが、今後、生物学的製剤療法下の RA 患者において、ELISPOT 法を用いた免疫学的診断法の結核症のモニタリングの有用性について検証していく予定である。

A. 研究目的

関節リウマチ（RA）の新しい治療法として生物学的製剤が導入され、画期的な臨床効果を示している一方、副作用としての日和見感染症が危惧されている。2002 年の日本における結核発症率は米国の 4.6 倍であり、生物学的製剤使用時の結核発症のリスクに関しても、これまでの欧米の成績よりは高頻度になると予想される。本研究では生物学的製剤導入前の RA 患者の結核合併例の臨床的特長を検討した上で、免疫抑制下にある RA 患者の結核に対する特異性の高い診断法の確立と、その応用につい

て検討することを目的とする。

B. 研究方法

1. 結核症合併 RA 患者の臨床的解析

1991 年当院開院以来、外来および入院にて抗結核薬治療を受けた 12 例（男性 4 例、女性 7 例、 62.8 ± 13.9 才）について、RA の病状、合併症、結核病変、治療、転帰などについて検討した。

2. 結核抗原特異的免疫応答の解析

i) 対象：当院 IRB の承認に基づき、インフォームドコンセントを得られた RA 患者、結核患者およびツベルクリン陽性健常者。

ii) サイトカイン定量(ELSIA)：ヘパリン加末梢血よりフィコール・ハイパークを用いた比重遠心法により分離した単核細胞(PBMC) $1 \times 10^6/\text{ml}$ を 10%胎児仔牛血清加 RPMI-1640 培地を用い、PPD および BCG と交差反応しないヒト結核菌に特異的な抗原である early secreted antigenic target (ESAT)-6 (Statens Seruminstitut, Denmark)存在下で 24 時間し、その培養上清の IFN- γ を ELSIA 法により定量した。

iii) サイトカイン産生細胞数の算定 (ELISPOT 法)：PBMC $1 \times 10^6/\text{ml}$ を PPD、ESAT-6 存在下で 2 時間前培養し、あらかじめ抗 IFN- γ 抗体(R&D 社)をコートしたニトロセルロース 96 穴平底プレート (Millipore, MA) 上で 1×10^5 あるいは $5 \times 10^4/\text{well}$ としてさらに 16 時間培養した。細胞を洗浄後、ビオチン化二次抗体、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを反応させ、BCIP/NBT で呈色反応後、スポット数を KS ELISPOT システム 4.4.35 (Carl Zeiss Co., Ltd., Germany)で算定した。

C. 研究結果

1. 結核症合併 RA 患者の臨床的解析

表 1 に、自験結核症合併 RA 患者 12 例の臨床像についてまとめた。関節病変の X 線所見は、Stage II から IV で、10 例にステロイド、4 例に MTX が使用され、一般的に複数の抗リウマチ薬、免疫抑制薬が使用されている例が多く難治例が多く認められた。結核発症時は炎症所見も高値を示し、リンパ球数は減少傾向を認めた。3 例がツベルクリン反応陽性を示したが、他の症例は施行されておらず、その診断的価値の評価は不可能であった。欧米の報告で指摘さ

れる肺外結核、粟粒結核は 3 例に見られた。死亡例を 1 例経験した。結核発症後、抗結核薬の効果が不十分で、ステロイド減量、MTX 中止を余儀なくされ、関節症状が増悪する例も経験した。

2. 結核抗原特異的免疫応答の解析

i) 結核特異的抗原刺激 PBMC による IFN- γ 産生 (ELSIA 法)

ツベルクリン反応陽性の結核患者および健常者 PBMC を PPD および ESAT-6 で刺激し、その培養上清中の IFN- γ の産生を ELISA 法により測定した。

ツベルクリン反応陽性健常者および結核患者のいずれにおいても、PPD 刺激 PBMC 中に多数の IFN- γ 産生細胞が検出された (Fig.1)。一方、ESAT-6 刺激による IFN- γ 産生は結核病棟従事者の 2 名以外はツベルクリン反応陽性健常者であっても検出感度以下であったが、結核患者においては有意な産生が検出された。

ii) 結核特異的抗原刺激 PBMC の IFN- γ 産生細胞数 (ELISPOT 法)

次に PPD あるいは ESAT-6 刺激 PBMC における IFN- γ 産生細胞数を ELISPOT 法により解析した (Fig.2)。(抗原特異的 IFN- γ 産生細胞数) = (抗原刺激時産生細胞数) - (抗原非存在下の自発的産生細胞数) として評価した。ELISA 法の結果とほぼ同様に、ツベルクリン反応陽性健常者および結核患者のいずれにおいても PPD 特異的 IFN- γ 産生細胞が検出されたが、ESAT-6 に対しては低頻度ながらも結核患者からのみ IFN- γ 産生細胞が検出された。以上の結果から、本法により BCG 接種によるツベルクリン陽性者と結核患者を鑑別することが可能と思われる。

インフリキシマブ治療中に臨床的に結核発症が疑われた 2 例について ELISPOT 法を用いた抗原特異的免疫応答を解析した。これらの疑い例では ESAT-6 刺激による IFN- γ 産生は検出されなかったが、経過観察より結核は否定的であり、予備研究の段階であるが、本法の有用性を推測させる。

D. 考案

自験例においては、RA 治療中の結核症例は関節病変の重症度、活動性が高いため、ステロイド、MTX など複数の抗リウマチ薬、免疫抑制薬が併用されていた。死亡例は 12 例中 1 例であったが、RA の治療により免疫抑制状態をきたすことから、結核治療との両立に難渋することが経験された。生物学的製剤が適応となる症例が、結核を罹患した場合には、このような問題はさらに重要となる。今回、解析した自験例では全例が肺病変を有し、粟粒結核、肺外病変を有する例は 3 例のみであったが、欧米では、インフリキシマブ投与時の結核の約半数は肺外結核であると報告されている。したがって、喀痰、胃液を検査材料とした細菌学的診断法では結核症の確定診断ができない可能性もある。免疫学的診断としてはこれまでツベルクリン反応が用いられてきた。ツベルクリン反応で用いられる抗原は PPD で、BCG ワクチンとアミノ酸配列の相同性が高く、免疫学的に交差反応が生じる。したがって、結核患者以外でも BCG ワクチン接種者や非定型抗酸菌感染症において、ツベルクリン反応結果がしばしば偽陽性を示し、診断の特異性という点で難がある。

抗結核免疫応答を検出するシステムとし

て QuantiFERON[®]-TB(QFT)診断キットが開発されている。抗原としては PPD のみでなく、第二世代として開発された BCG や非定型抗酸菌との交差反応性を示さないヒト結核菌抗原に特異的な ESAT-6 や culture filtrate protein (CFP)-10 が用いられている。方法はこれらの抗原を全血に加え、白血球から産生される IFN- γ を指標とし、結核菌に対する特異的免疫応答を判定するものである。しかしながら、生物学的製剤により高度に免疫能が低下している状態ではより感度の優れた方法が必要とされる。

私どもは、予備的実験で、マイトジェン刺激 PBMC の培養上清中のサイトカイン (IL-4、IFN- γ など) 産生を ELISA 法と ELISPOT 法で比較し、両者間に強い相関があることを認めている。さらに、感度の点で、検出限界が 1-10 pg/ml である ELISA 法に比較して、ELISPOT 法は数十~数百 fg レベルの、単一細胞によるサイトカイン産生の検出が可能であることを確認している。これらの結果から、ELISPOT 法の応用は、より精度の高い診断法につながる可能性がある。現実には、南アフリカにおける Human immune deficiency virus (HIV) 感染者、栄養失調など免疫不全状態にある小児を対象とした結核に対する免疫反応についての報告では、PPD によるツベルクリン反応に比較して、ESAT-6、CFP-10 抗原刺激による IFN- γ 産生細胞数を指標とした ELISPOT 法を用いた解析の方が感度の点で優れていると結論している。私どものこれまでの検討でも ESAT-6 刺激による抗原特異的 IFN- γ 産生細胞数の解析結果は結核診断に有用である可能性が高い。今後、多様な免疫状態、治療状況にある症例についての成績を蓄積し、

本法が診断的に有用であることを検証するとともに、生物学的製剤使用時の感染症のモニタリングの一助となることを期待したい。

E. 結論

1. 関節リウマチ治療中に結核症を合併した自験12例の臨床的特長として、活動性が高く、ステロイドを含む複数の免疫抑制薬が必要な例が多く、概して結核治療に難渋する例が多い。
2. PPDおよびヒト結核に特異的な抗原であるESAT-6を抗原とし、ELISPOT法を用いて、抗原特異的IFN-g産生を指標とした結核症の免疫学的診断の有用性について検討中である。今後、生物学的製剤使用時の結核モニタリングへの応用を考慮したい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

2. 学会発表

- 1) 結核を併発したリウマチ性疾患7症例の臨床的検討：大野美香子，小林弘，泉二恭輔，上田敦久，岳野光洋，石ヶ坪良明
日本リウマチ学会総会 2004年4月
- 2) リウマチ性疾患におけるFDG-PETの有用性：小林弘，大野美香子，零石一也，泉二恭輔，上田敦久，岳野光洋，井上登美夫，石ヶ坪良明
日本リウマチ学会総会 2004年4月
- 3) 過去3年間の当施設における結核初回治療時の副作用出現頻度：小林正芳，金子猛，篠原岳，三島渉，田川暁大，掛水信将，築地淳，小松茂，西山晴美，石ヶ坪良明

日本内科学会関東地方会 2004年2月

- 4) FDG-PETにより偶然発見された肺結核症の一例：三浦健次，小松茂，築地淳，掛水信将，西山晴美，金子猛，石ヶ坪良明

神奈川感染症医学会 2004年7月

- 5) 関節リウマチに対するmethotrexate投与後に発症した悪性リンパ腫の3例：宮崎拓也，立花崇孝，藤巻克通，富田直人，高崎啓孝，高林真紀，山路聡，小原沢英之，田口淳，金森平和，石ヶ坪良明

日本血液学会・日本臨床血液学会回総会
2004年9月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1. 結核合併関節リウマチ患者自験12例の臨床像

性/年齢	Stage	RA治療				検査所見										肺病変	肺外病変	結核治療	合併症	転帰
		PSL	MTX	その他	ESR (mm/h)	CRP (mg/dl)	RF (IU/ml)	WBC (/μl)	リンパ球 (/μl)	IgG (mg/dl)	ツ反	肺病変	肺外病変	結核治療	合併症					
1 男	75	(リタリン)		ATM	109	6.7	20.2	6700	1454	2460	0x0/18x17	rV1 P1	HRE		HRE					
2 女	44	70 mg (IP)		AZP	10.2	(-)	3100	279	1050	0x0/9x11	bIII3	粟粒・脳結核	HR・SM	HR・SM	IP					
3 女	56	20 mg			46	3.8	9.3	11800	944	1120	rII2	HRE	HRE	HRE						
4 男	67	5mg	7.5 mg/wk	ATM	102	10.2	724.7	10400	1248	1540	PI?	HRE	HRE	HRE						
5 女	59		7.5 mg/wk	bucillamine actarit	13	0.4	147.4	3800	760	1550	rIII1	HRE	HR・SM*	HR・SM*						
6 女	53	10mg		SASP actarit ATM	145	8.5	195.2	11800	708	2920	bII2	HRE・SM	HRE・SM	HRE・SM						
7 男	73	20 mg			109	8.3	380.7	17800	1388		bII2	HRE・SM	HRE・SM	HRE・SM						
8 女	82	7.5 mg		auranofin	89	20.7	23200	928			bIII3	HRE	HRE	HRE						
9 男	80	8 mg		MZB	119	10.4	5400	648	2010		bIII2	HRE	HRE	HRE						
10 女	73	5 mg	2mg/wk	MZB	46	24.6	82.5	6500	98		bIII3	粟粒	HREZ	HREZ						
11 女	49	10 mg	8 mg/wk	MZB	121	8.6	17.4	8700	914	1850	bII2	足関節	HREZ*	HREZ*	SLE					
12 女	43			SASP	0	14.6	4800	1114		22x22/35x25	bIII1		HREZ	HREZ						

ATM: 金チオリニンゴ酸ナトリウム, AZP: アザチオプリン, SASP: サラゾルスルファピリジン, MZB: ミゾリピン,
H: イソニアジド, R: リファンピシン, E: エタンブトール, Z: ピラジナミド, SM: ストレプトマイシン, * 治療追加, 変更
IP: 間質性肺炎

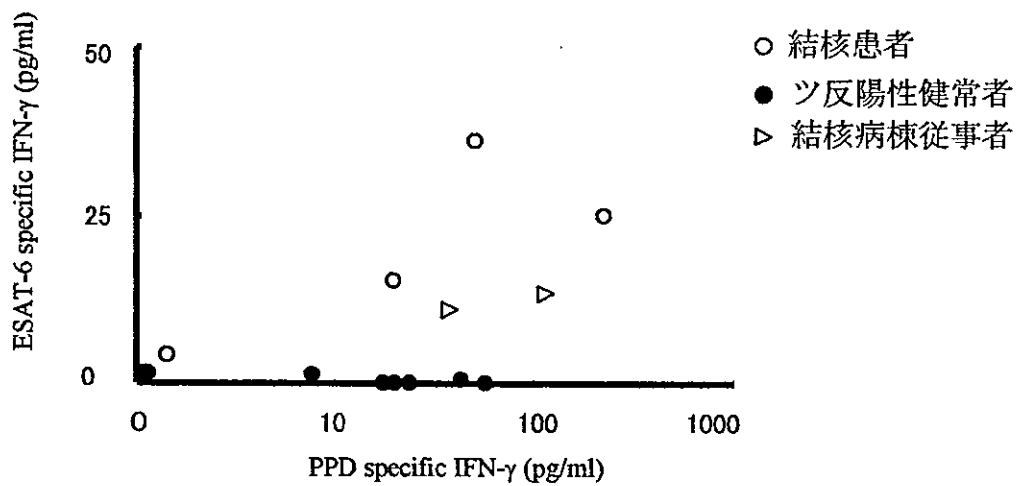


図 1 結核患者、ツ反陽性健常者PBMCにおける PPD、ESTA-6刺激によるIFN- γ 産生

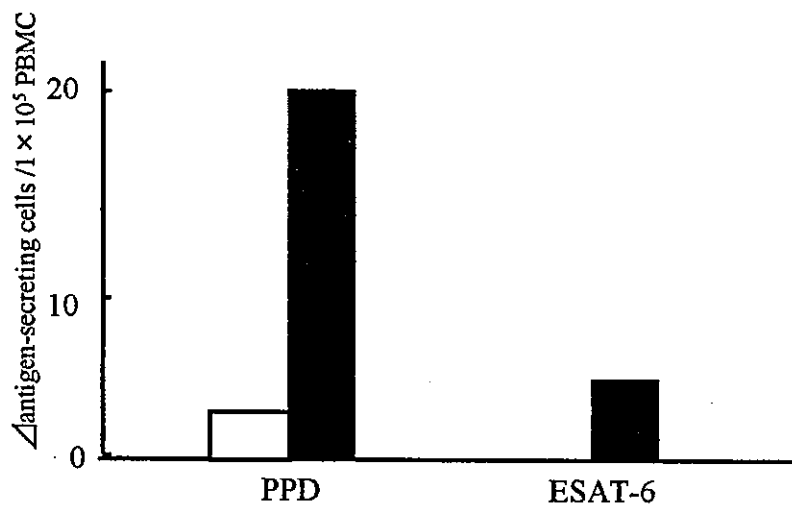


図 2 結核患者、ツ反陽性健常者PBMCにおけるPPD、ESTA-6特異的IFN- γ 産生細胞数

Δ antigen-secreting cells = (antigen stimulated IFN- γ secreting cells)
 - (spontaneous IFN- γ secreting cells)

TNF α 阻害療法下における結核発症予防法の開発と標準化に関する研究

分担研究者 朝野和典 大阪大学医学部附属病院 感染制御部 助教授

研究要旨 TNF α 阻害療法(MTX 併用)に INH の予防内服を併用すれば、ほとんどの症例について結核発症が予防可能であると現時点では考えられる。①10mg/日以上 of PSL 内服、②コントロール不良の糖尿病の合併、③治療導入・強化時の結核の顕在化、④N-acetyltransferase-2 の Rapid 代謝ホモ型(による INH 血中濃度の低下)が INH 予防内服併用下の免疫抑制治療での結核発症危険因子であり、今後の追跡が必要であると考えられた。

A. 研究目的

スペインでの infliximab および etanercept 市販後調査により、TNF α 阻害療法下の関節リウマチ(RA)症例における潜在感染からの結核発症のほとんどの例が6~9ヶ月間の INH 内服の併用により予防可能であり、また副作用も軽微であると報告されている。しかし、我が国において、INH 予防内服併用下の免疫抑制治療中に結核を発症する膠原病症例また、INH 内服に伴う重症の副作用発現例を時に経験する。今回我が国のレミケード®(infliximab)市販後全例調査において結核を発症した RA 症例の解析により、結核を発症する危険因子を検討した。

B. 研究方法

今回我々は、レミケード®市販後全例調査において INH 予防内服併用下に結核を発症した RA 症例、および免疫抑制治療中に結核を発症し国立病院機構刀根山病院に入院した膠原病症例 10 例における結核発症の要因について、①10mg/日以上のプレドニゾン(PSL)内服、②コントロール不良の糖尿病の合併、③結核症が既に顕在化していた可能性(治療開始時の胸部単純写真、CT、ツ反結果)、④INH 血中濃度が低下していた可能性(服用下での血中濃度およびその加水分解酵素である N-acetyltransferase-2(NAT2)の多型)、⑤INH 耐性結核であった可能性(頻度)の5点を検討した。

また INH 内服に伴う副作用についても検討した。

(倫理面への配慮)

レミケード®市販後全例調査症例については、調査委員会の方針に従った。また刀根山病院症例については連絡可能な8例について調査内容について説明し同意を得た。

C. 研究結果

今回のレミケード®市販後全例調査において INH 予防内服併用下に結核を発症した RA 症例は無かった。

結核を発症して刀根山病院に入院した 10 症例の内訳は RA 症例6例、全身性エリテマトーデス(SLE)症例3例、多発性筋炎(PM)症例1例であった。

RA6症例全例で INH 併用は無かった。結核発症要因のうち、①の10mg/日以上のPSL服用を3例、②の糖尿病合併を2例、③の治療開始・強化時の結核顕在化の可能性を2例で認めた。また入院治療時に INH に対するアレルギーを2例で合併したが、2例とも④の Slow 代謝ホモ型の NAT2と血中 INH 濃度の上昇を認めた。

SLE3症例と PM1症例では、①の10mg/日以上のPSL服用を4例全て、②の糖尿病合併を2例、③の治療開始・強化時の結核顕在化の可能性を1例、INH 予防内服を併用した3例全てで④の Rapid 代謝ホモ型の NAT2と血中 INH 濃度の低下を認めた。今回の10症例の中には INH 耐性結核例を認めなかった。

D. 考察

今回の調査で INH 予防内服併用下のレミケード[®]投与症例には結核の発症を認めなかったが、上記の①～④の4点を満たす症例については、INH 予防内服併用中であっても結核(特に肺外結核)の活性化・発病の有無について追跡する必要があると考えられる。

この追跡の方法には、①結核菌表面の糖脂質に対する抗体(抗抗酸菌抗体)の血清濃度測定(デタミナー TBGL[®]抗体、Myco Dot[®])、②ヒト型結核菌に特異的な成分で刺激した患者Tリンパ球のIFN- γ 産生の測定法(QuantiFERON-TB[®])、③治療導入時の二段階ツ反の実施およびツ反の経年的変化などが考えられるが、RA 自体および治療薬による反応性の低下が予想されるため、本邦の RA 症例でのこれらのスクリーニング検査の有効性および基準値を検討している。

INH 併用による副作用について、MTX 併用下のレミケード[®]投与症例においてアレルギー症状は稀であるが、Slow代謝ホモ型のNAT2を示す症例ではINH血中濃度上昇に伴う肝障害等に注意する必要があると考えられた。

E. 結論

TNF α 阻害療法(MTX併用)にINHの予防内服を併用すれば、ほとんどの症例について結核発症が予防可能であると現時点では考えられる。

①10mg/日以上のPSL内服、②コントロール不良の糖尿病の合併、③治療導入・強化時の結核の顕在化、④N-acetyltransferase-2のRapid代謝ホモ型(によるINH血中濃度の低下)がINH予防内服併用下の免疫抑制治療での結核発症危険因子であり、今後の追跡が必要であると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 朝野和典、橋本章司:関節リウマチの治療薬療法有害事象とその対策 生物学的製剤—結核予防を中心に. 日本臨床増刊号 関節リウマチ, p573-578, 日本臨床社, 2005.

2) 橋本章司、田邊雅章、朝野和典:プロカルシトニンの臨床的意義. 医学の歩み, 211(2):205-210, 2004.

2. 学会発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録

特になし

膠原病・リウマチ性疾患の治療中に併発したカリニ肺炎の早期診断と1次予防基準の作成に関する研究

分担研究者 田中良哉 産業医科大学医学部第一内科学講座 教授

研究要旨

生物学的製剤や新規抗リウマチ薬は、高い臨床的有用性をもつが、その一方で併発する感染症への対策遅れている。特に、カリニ肺炎は時に致命的となる重要な合併症であるにもかかわらず診断法・1次予防基準が不十分である。今年度は、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、本法にてリウマチ性疾患に併発するカリニ肺炎の床的特徴の再評価の上、発症リスクとして①PSL換算1mg/kg以上または②PSL換算0.5mg/kg以上かつ免疫抑制薬併用、かつ③リンパ球400/mm³あるいは④IgG700mg/dl以下を抽出した。さらに、該当者にST合剤による1次予防を施行したところ、RA以外のリウマチ性疾患でのカリニ肺炎の発症は完全に抑止し得た。しかし、同基準に該当しないRA2例でカリニ肺炎が確認され、2例とも極早期にDNA診断し得たため早期治癒せしめたが、RAにおけるカリニ肺炎に関しては他のリウマチ性疾患と分別した新たな1次予防基準の定が急務と考えられた。

A.研究目的

関節リウマチ（RA）を始めとする膠原病・リウマチ性疾患に対する生物学的製剤や抗リウマチ薬の台頭は、画期的な治療効果を齎したが、その一方で、免疫抑制による日和見感染症の問題がクローズアップされてきた。生物学的製剤の使用時の結核発症に関しては、多くの専門家により精力的に対策が練られ、1次予防基準が提唱された。しかし、カリニ感染症に関しては、結核よりも高頻度で、かつ、時に致死性であるにも拘らず、対策が著しく立ち遅れ、診断法のみならず、欧米ですら1次予防基準は確立されておらず、また、1次予防基準設定に必要なカリニ肺炎発症患者の背景に関する十分な検討さえなされていない。今後、予定される生物学的製剤の使用に於いても、カリニ肺炎の早期迅速診断・予防などを含めた対策が不可避である。本研究では、リウマチ性疾患に対する生物製剤療法施

行時に併発するカリニ肺炎に関して、1) カリニ肺炎の早期・特異的DNA診断法を確立する、2) 患者背景を解析し、臨床的特徴を明確にする、3) それらの情報を基にした一次予防基準を設定する、4) 一次予防法を提唱し、予防効果と一次予防基準を検証する事を目的とする。

B.研究方法

リウマチ性疾患加療中に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53症例に誘発喀痰を用いたカリニ特異的DNA診断を施行した。生食10mlを超音波ネブライザーにて吸入した後、喀出喀痰（誘発喀痰）を検体として採取した。Dithiothreitol、proteinase K処理後、phenol/chloroform抽出、エタノール

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。さらに、患者背景からカリニ肺炎発症のリスクを抽出し1次予防基準を設定の上、実践シアウトカムを検討した。

(倫理面への配慮)

患者喀痰の採取に関しては、通常の診療に必要な検査検体の一部を用いる。また検体中のカリニDNAのみを検査対象とし、患者の遺伝子検索は施行しないことより、倫理面での問題は特にないと考える。患者の個人情報が所属機関外に漏洩せぬよう、試料や解析データは万全の安全システムをもって厳重に管理し、人権擁護に努めると共に、患者は、経済的負担を始め如何なる不利益や危険性も被らない事を明確にする。

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リウマチ性疾患患者53名中27名(SLE9名、PM/DM7名、MRA4名、MPA3名、MCTD3名、その他1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よりカリニ肺炎の1次予防基準を抽出し、

- ①経口ステロイド単独ではPSL換算1mg/kg以上
- ②PSL換算0.5mg/kg以上かつ免疫抑制薬併用
- ③リンパ球400/mm³
- ④IgG700mg/dl以下

①あるいは②、かつ、③または④と設定した。この基準を満たす症例に対して、ST合剤による1次予防を施行したところ、1次予防施行者からのカリニ肺炎発症者は皆無となった。一方、この基準に該当しない

RA患者からのカリニ肺炎の併発が2名に発症が確認された。2名ともDNA診断により最短8時間で診断され、ST合剤投与にて完治した。

上記1次予防基準にて過去2年間の該当患者78名にST合剤の1次予防投与を施行したが、計22名(28%)に副作用が認められ(皮疹10名、肝障害5名、発熱6名、血球減少2名など)同薬の市販後調査における有害事象発現率(10.58%)に比して明らかに高率であった。これらの症例ではペンタミジン吸入への変更を要した。

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ができ、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診断では高感度がゆえに、偽陽性がしばしば問題となるが、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。

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。しかしながら、ST合剤の使用にあつたては、リウマチ性患者では一般的に報告されているST合剤の有害事象の発現率の約3倍であり、また副作用の発現の92%が投与2週間以内に生じており、少なくともこの期間には注意深い経過観察が必要である。

しかし、RAでは、レフルノミドや生物学的製剤使用症例に於いて1次予防基準に該当しないカリニ肺炎発症が認められた。RAでは、ステロイド服用量は少量であり、本基準には殆どの症例は該当しない。βグ

ルカン高値、高齢者、既存肺疾患、血球減少、糖尿病合併などがカリニ肺炎発症のリスクであると想定されるが、他のリウマチ性疾患と分別化した RA 独自の 1 次予防基準設定が必要であり、症例の蓄積を要すると思われる。

E. 結論

RA の新規治療は、画期的な臨床効果を齎すが、日和見感染症として併発する PCP は時に致死的となり、早期診断の重要性が再認識される。早期・迅速診断および治療効果判定に極めて有用な誘発喀痰を用いた PCR 法による DNA 診断の普及が望まれる。また、RA 独自の一次予防基準の設定およびその継続期間に関しては、多施設でのさらなる詳細な検討を要する。さらに、RA の主たる治療薬であるメトトレキサートと ST 合剤は葉酸阻害を増強することより併用注意であることについても検討を要する。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Saito K, Nakayamada S, Nakano K, Tokunaga M, Tsujimura S, Nakatsuka K, Adachi T, Tanaka Y. 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* (2004) **43**, 479-485
2. Nakano K, Okada Y, Saito K, Tanaka Y. Fibroblast growth factor-2 induces receptor activator of nuclear factor kappa B ligand expression and osteoclast maturation by binding to heparan sulfate proteoglycan on rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* (2004) **50**, 2450-2458

3. Tsujimura S, Saito K, Nakayamada S, Nakano K, Tsukada J, Kohno K, Tanaka Y. Transcriptional regulation of multidrug resistance-1 gene by interleukin-2 in lymphocytes. *Genes Cells* (2004) **9**, 1265-1273
 4. Tokunaga M, Fujii K, Saito K, Nakayamada S, Tsujimura S, Nawata M, Tanaka Y. Down-regulation of CD40 and CD80 on B cells in patients with life-threatening systemic lupus erythematosus after successful treatment with rituximab. *Rheumatology* (2005) **44**: 176-182
 5. Nakayamada S, Kurose K, Saito K, Mogami A, Tanaka Y. Small GTP-binding protein rho-mediated signaling promotes proliferation of rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther* (in press)
 6. Tsujimura S, Saito K, Nakayamada S, Nakano K, Tanaka Y. Clinical relevance of expression of P-glycoprotein on peripheral lymphocytes to steroid-resistance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* (in press)
 7. 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*(2004) **23**, 134-138
 8. 田中良哉、齋藤和義. 膠原病に於ける日和見感染症とその対策. *日本内科学会雑誌* (2004) **93**, 1654-1659
- ### 2. 学会発表
1. Tanaka Y, Tokunaga M, Fujii K, Nawata M, Tsujimura S, Nakayamada S, Saito K. A pilot study of rituximab (anti-CD20) for refractory systemic lupus erythematosus: relevance of quantity and quality reduction of B cells to clinical efficacy. The 68th National Meeting of American college of Rheumatology, San Antonio. 平成 16 年 10 月
 2. 田中良哉. 生物学的製剤. 第 48 回日本リウマチ学

厚生労働科学研究費補助金 (免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業)
分担研究報告書

infliximab 投与中に合併したカリニ肺炎自験 2 症例の臨床的検討

主任研究者 宮坂信之 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科膠原病・リウマチ内科学 教授

研究要旨 infliximab は関節リウマチに対して、高い有効性を挙げている。しかし、一方では肺炎、結核症、カリニ肺炎 (以下 PCP) などの日和見感染症の合併が問題となっている。特に infliximab 投与期間中の PCP に関しては欧米での報告がきわめて少ないことから、我が国特有の副作用である可能性が高い。その詳細については不明であるため、自験 2 症例について臨床的検討を行った。

A. 研究目的

関節リウマチに対して infliximab が平成 15 年 7 月に認可されて以来、これまでに全国で 5260 症例 (平成 17 年 1 月現在) に本剤が使用され、高い有効性を挙げている。しかし、その一方では肺炎、結核症、カリニ肺炎 (以下 PCP)、深在性真菌症、帯状疱疹などの日和見感染症の合併が問題となっている。特に infliximab 投与下での PCP に関しては欧米での報告が少ないことから我が国特有の副作用である可能性が高い。その発症機序及び危険因子としては、infliximab の TNF α 阻害作用による感染防御能の低下、長期の罹病、肺線維症の合併、prednisolone (PSL) または methotrexate (MTX) などの免疫抑制剤の併用などが考えられるが、その詳細については不明である。このため、infliximab 投与中に PCP を発症した自験 2 症例について臨床的検討をいったので報告する。

B. 研究方法

自験 2 例に関するデータは入院および外来診療録から収集し、国内の使用成績調査にて他施設から報告された 5 例については、同調査の集積データを基に解析した。

PCP は、1) 乾性咳嗽・呼吸困難などの呼吸器症

状、2) PaO₂ 80mmHg 以下もしくは A-aDO₂ 15torr 以上の低酸素血症、3) 胸部レントゲン上のスリガラス状陰影、胸部 CT 上のび慢性の淡い肺野濃度上昇または浸潤影のような PCP を示唆する画像所見、4) trimethoprim-sulfamethoxazole (以下 TMP/SMX) または pentamidine isetionate 投与に対する治療反応性、5) 血清 β -D グルカン高値、6) 気管支肺胞洗浄液あるいは喀痰からのカリニ DNA の検出を参考に総合的に診断した^{1)~4)}。

(倫理面への配慮)

解析対象症例の個人情報が開示されないよう配慮した。

C. 研究結果

1. 自験例の解析

<症例 1> 52 歳、男性。主訴：発熱。喫煙歴：20-49 歳に 1 日 15 本。合併症：濾胞性細気管支炎。現病歴：2000 年 2 月より多関節炎が出現し、2001 年 2 月関節リウマチ (RA) と診断され、auranofin, bucillamine を開始したが無効。2003 年 1 月より MTX 4mg/week を併用したが効果不十分のため、3 月当科紹介受診。salazosulfapyridine を投与したが、発熱、皮疹が出現したため中止した。5 月より MTX 10mg/week, PSL 10mg/day に増量したが改善せず、8 月 12 日より