

(BMD) and to an increased risk of fracture¹. Several epidemiologic studies have reported a doubling of the risk of hip fracture for users of glucocorticoids²⁻⁴, while large-scale studies have demonstrated a rapid increase in fracture risk following the start of glucocorticoid therapy and a strong correlation of risk with daily glucocorticoid dose^{4,5}. Other smaller studies have shown that the cumulative dose, rather than the daily dose, was the more reliable and accurate predictor of fracture^{6,7}. When high dose glucocorticoids are used, the loss of bone such as vertebrae can be rapid and lead to vertebral compression fractures within a few months.

Glucocorticoids are also known to affect bone through various pathways, affecting mainly bone formation and, to a lesser extent, bone resorption^{8,9}. Findings have been accumulating about the possible role of micro-architectural changes in glucocorticoid induced fracture, although fracture in glucocorticoid users may also occur simply as a result of bone loss. A recent hypothesis is that osteocyte apoptosis is an important factor in deterioration of bone quality and the concomitant rapid increase in the risk of fracture¹⁰. In addition, there is a report that glucocorticoid users with fracture had considerably higher BMD than patients with fracture due to primary osteoporosis¹¹. These reports support the notion that a non-BMD-related mechanism may also be responsible for inducing fracture in users of glucocorticoids¹².

We conducted a multicenter, cross-sectional analysis, specifically investigating high dose glucocorticoid users treated for autoimmune diseases, to determine the BMD cutoff value for the risk of vertebral fracture, and to examine the correlation between glucocorticoid induced vertebral fracture or loss of BMD and multiple factors including menopause, glucocorticoid dose, and other glucocorticoid induced secondary complications.

MATERIALS AND METHODS

Study population of glucocorticoid users. Data on 160 Japanese women, aged 16–85 years and treated with glucocorticoids for autoimmune diseases, were collected from the rheumatology departments of 11 institutions that joined the Research Committee for Glucocorticoid-Induced Osteoporosis organized by the Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare. This study was limited to patients who had been receiving oral glucocorticoid therapy (mean daily dose 0.5 mg/kg prednisone or equivalent) for at least 1 month between April 1998 and March 2003. The basic clinical data including risk factors and dose and duration of glucocorticoid therapy were collected retrospectively by treating physicians in reference to medical records from each institution, and the collected data were reviewed by the central committee for selecting eligible patients. As for treatment or prevention of osteoporosis, there were no restrictions for enrollment of patients based on protocols for the use of bisphosphonates, calcium, vitamin D, or other antiresorptive drugs. Diseases they were treated for included systemic lupus erythematosus (SLE; 79 cases), Sjögren's syndrome (15 cases), polymyositis (13 cases), mixed connective tissue disease (12 cases), adult onset Still's disease (8 cases), polymyalgia rheumatica (7 cases), dermatomyositis (6 cases), systemic sclerosis (5 cases), and others (15 cases). Patients with rheumatoid arthritis were excluded from this study.

BMD of the patients was assessed for the lumbar spine (L2–L4), femoral neck, and radial head by means of dual-energy x-ray absorptiometry

(DEXA). Since the DEXA machines used for the measurement of BMD differed from hospital to hospital, the raw BMD values were converted to comparable values for the QDR-2000 (Hologic Inc., Waltham, MA, USA) as described¹³. High dose glucocorticoid therapy was defined as a mean daily dose > 0.5 mg/kg of prednisone or equivalent dose of other glucocorticoids for at least 1 month.

Vertebral fracture was confirmed radiologically by lateral radiographs of the thoracolumbar spine with the method established by Orimo, *et al*¹⁴; the presence of vertebral fracture was semiquantitatively confirmed if either the ratio of middle/anterior or middle/posterior height of a vertebral body was < 0.8, or the ratio of anterior/posterior height of a vertebral body was < 0.75. The judgment of fracture was double-checked by 2 examiners in each institution. If BMD was measured more than once in the same patient, the last BMD value was adopted for patients without vertebral fracture, and for patients with fracture, the BMD measured at the timepoint nearest the radiological confirmation of initial vertebral fracture was used.

The daily, cumulative, and maximum glucocorticoid doses, and the total duration (in days) of prior glucocorticoid therapy were also entered into the analysis. Clinical factors that may affect the occurrence of vertebral fracture, comprising age, body mass index (BMI), menopause, BMD (T scores), hypertension, total cholesterol, and HbA1c were evaluated. Diagnoses for hypertension and diabetes mellitus were determined according to American Heart Association¹⁵ and American Diabetes Association¹⁶ guidelines, respectively. Hyperlipidemia was diagnosed according to the criteria of the Japanese Atherosclerosis Society¹⁷, in which total cholesterol level > 220 mg/dl is regarded as hyperlipidemia.

Statistical analysis. Logistic regression analysis was used to calculate the influence of various variables on vertebral fracture including age, BMI, menopause, BMD, and glucocorticoid related parameters. For determination of BMD cutoff values to identify women with vertebral fracture, sensitivity, specificity, and BMD cutoff values were calculated using receiver-operating characteristics curve (ROC) analysis. As for patients with vertebral fracture, the chi-square test was used to determine the difference in BMD between premenopausal and postmenopausal glucocorticoid users. P values < 0.05 were deemed to be statistically significant. The MedCalc statistical analysis software package (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium) was used for statistical analyses.

RESULTS

Variables affecting vertebral fracture in high dose glucocorticoid users. For this study, 160 patients were assessed. The baseline information of enrolled patients is shown in Table 1. BMD values of this group negatively correlated with patients' age ($p < 0.001$, $r = -0.366$). A logistic regression analysis of patients with vertebral fracture (fracture group) and those without vertebral fracture (non-fracture group) is presented in Table 2. The respective mean BMD values of the fracture group (35 cases; 19 postmenopausal, 16 premenopausal) and the non-fracture group (125 cases) were 0.781 and 0.871 g/cm² ($p = 0.004$). There was a significant difference between the 2 groups in BMI and BMD, but no difference in age, ratio of menopause, and total glucocorticoid dose, as shown in Table 2. The logistic regression analyses including the other glucocorticoid related variables such as cumulative days of glucocorticoid use, mean glucocorticoid dose (daily), cumulative glucocorticoid dose, and maximal glucocorticoid dose showed no significant difference between the 2 groups (data not shown). The mean daily glucocorticoid dose for premenopausal women (age 34.9 ± 9.4 yrs) was 16.4 ± 16.5 mg/day and for postmenopausal

Table 1. Baseline characteristics of 160 patients in the study.

	Premenopausal	Postmenopausal	Total	p
Age, yrs, mean ± SD	34.9 ± 9.4	62.6 ± 9.9	47.9 ± 16.9	< 0.05
BMI, kg/m ²	21.7 ± 14.1	22.0 ± 3.5	21.9 ± 3.6	NS
BMD, g/cm ²	0.926 ± 0.149	0.767 ± 0.149	0.852 ± 0.168	< 0.05
Daily prednisolone dose*, mg/day	16.4 ± 16.5	10.7 ± 9.9	13.7 ± 14.1	< 0.05
Cumulative dose of prednisolone*, g	17.1 ± 31.3	8.2 ± 10.4	12.8 ± 24.0	NS
Duration of glucocorticoid treatment, days	1993.1 ± 2091.9	2069.9 ± 2317.4	2027.8 ± 2189.4	NS

* Adjusted to the dose equivalent to prednisolone. NS: not significant.

Table 2. Logistic regression analysis of treatment related variables and vertebral fracture in high dose user of glucocorticoid.

	Vertebral Fracture		Z	p
	Yes	No		
Age, yrs, mean ± SD	50.7 ± 3.2*	47.1 ± 1.4	0.5925	0.554
Menopause (%)	19/35 (54.3)	56/125 (44.8)	0.270	0.787
BMI	22.4 ± 0.8	21.8 ± 0.3	1.961	< 0.05
BMD, L2-4, g/cm ²	0.781 ± 0.033	0.871 ± 0.014	2.218	< 0.03
Total glucocorticoid dose*, g	24.3 ± 6.6	22.2 ± 4.4	0.789	0.430

* Adjusted to the dose equivalent to prednisolone.

women (age 62.6 ± 9.9 yrs) 10.7 ± 9.9 mg/day (p < 0.05). Compared to postmenopausal glucocorticoid users, premenopausal glucocorticoid users had significantly higher average BMD (L2-L4) in the lumbar spine, femoral neck, and radial head (data not shown).

For postmenopausal women, the mean BMD value of the fracture group was significantly lower than that of the non-fracture group (p < 0.01), as shown in Figure 1. In contrast,

there was no significant difference in BMD values between the fracture group and non-fracture group among premenopausal women. Of special interest is that 7 of the 16 premenopausal patients (43.7%) in the fracture group showed normal values (T score > -1), whereas only one of the 19 postmenopausal patients (5.3%) did (p < 0.01). There was no statistically significant difference between the fracture group and non-fracture group for maximum glucocorti-

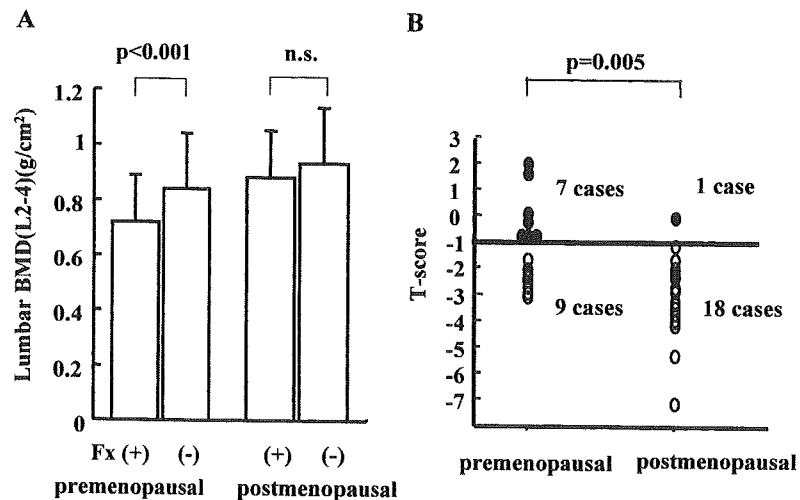


Figure 1. (A) Lumbar BMD from fracture (Fx) and non-fracture patient groups taking high dose glucocorticoids. There were significant differences in lumbar BMD between fracture and non-fracture groups in premenopausal women (p < 0.001), whereas no difference was detected between the 2 groups in postmenopausal women. ns: not significant. (B) T scores from premenopausal or postmenopausal women with vertebral fracture. Premenopausal glucocorticoid users frequently incurred vertebral fracture even when BMD was not reduced (T > -1) compared with postmenopausal women (p = 0.005). ●: fracture patients whose T scores were not reduced.

coid dose, mean daily glucocorticoid dose, disease background, and history of methylprednisolone pulse therapy in premenopausal women (data not shown).

BMD cutoff values for vertebral fracture in glucocorticoid users assessed by ROC analysis. ROC analysis was used to determine the BMD cutoff level for vertebral fracture in high dose glucocorticoid users. The cutoff values were defined as the values that proved to be effective for the sensitive and specific differentiation of subjects with and without vertebral fracture. As shown in Figure 2, the cutoff values for the risk of vertebral fracture for premenopausal, postmenopausal, and total patients were 0.843, 0.787, and 0.787 g/cm², respectively.

Hyperlipidemia correlates with BMD value and vertebral fracture. The influence of common glucocorticoid induced complications such as hyperlipidemia, diabetes mellitus, and hypertension on vertebral fracture were not entered into the logistic regression analysis, since those variables are not recognized as independent to glucocorticoid dose-related variables. Table 3 shows that hyperlipidemia has negative correlation with BMD, while HbA1c level did not correlate with BMD values. Nor did hypertension correlate with the level of BMD (data not shown). Then we compared patients with normal total cholesterol (< 220 mg/dl) value to those with above-normal values for further analysis. The peak value of total cholesterol after initiation of glucocorticoid therapy was used for the analysis in each patient. When we raised the comparative total cholesterol level to > 280 mg/dl, patients with high total cholesterol (> 280 mg/dl) value had

lower BMD ($p = 0.016$) and higher risk of vertebral fracture (relative risk 3.1, $p = 0.032$) than those with normal total cholesterol level (Figure 3). These results suggest that hyperlipidemia following high dose glucocorticoid therapy may contribute to the risk for BMD reduction and vertebral fracture.

DISCUSSION

High dose glucocorticoid therapy is often the first choice for patients with autoimmune diseases, such as SLE, that frequently affect premenopausal women. Although the efficacy of bisphosphonate has recently been reported in high dose glucocorticoid users¹⁸, there is only limited knowledge of the clinical risk factors for secondary osteoporosis occurring in high dose glucocorticoid users. This is the first extensive study focusing on the relationship of vertebral fracture and BMD in patients with high dose glucocorticoid therapy. We observed unique effects of high dose glucocorticoid therapy: First, the BMD cutoff value for the risk of vertebral fracture applicable to premenopausal glucocorticoid users was higher than that applicable to postmenopausal glucocorticoid users. Second, premenopausal glucocorticoid users, even with normal BMD values, were found to frequently incur vertebral fracture. Third, hyperlipidemia significantly correlated with vertebral fracture and low BMD.

ROC analysis showed that the BMD cutoff value for the risk of vertebral fracture for premenopausal women was 0.843 (T score = -1.7) and for postmenopausal women 0.787 (T score = -2.1). These cutoff values lie between 70% (T score = -2.6) and 80% (T score = -1.7) of the young adult

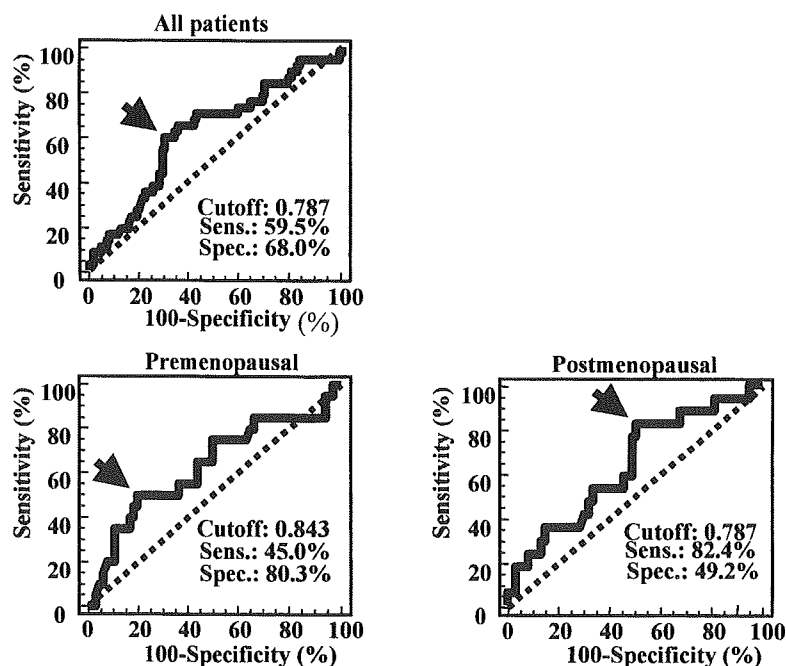


Figure 2. ROC analysis of lumbar BMD values for all patients, premenopausal and postmenopausal patients with vertebral fracture treated with high dose glucocorticoid. Arrows indicate cutoff points. Sens: sensitivity; Spec: specificity.

Table 3. The relationship between other glucocorticoid related complications and BMD or vertebral fracture in high dose glucocorticoid users (chi-square test).

Vertebral Fracture	Yes	No	p
Diabetes mellitus	26	134	
HbA1c, mg/dl*	7.68 ± 1.93	5.15 ± 0.66	< 0.01
BMD, g/cm ²	0.858 ± 0.149	0.850 ± 0.17	NS
Vertebral fracture, yes/no (%)	5/21 (19.2)	29/105 (21.6)	NS
Hyperlipidemia (cases)	95	65	
Total cholesterol, mg/dl*	283.2 ± 54.8	207.8 ± 23.0	< 0.01
BMD, g/cm ²	0.834 ± 0.176	0.876 ± 0.173	0.03
Vertebral fracture, yes/no (%)	23/72 (24.2)	11/54 (16.9)	NS

* Peak values after glucocorticoid therapy are shown. Patients whose value was > 220 mg/dl was defined to have hyperlipidemia. NS: not significant.

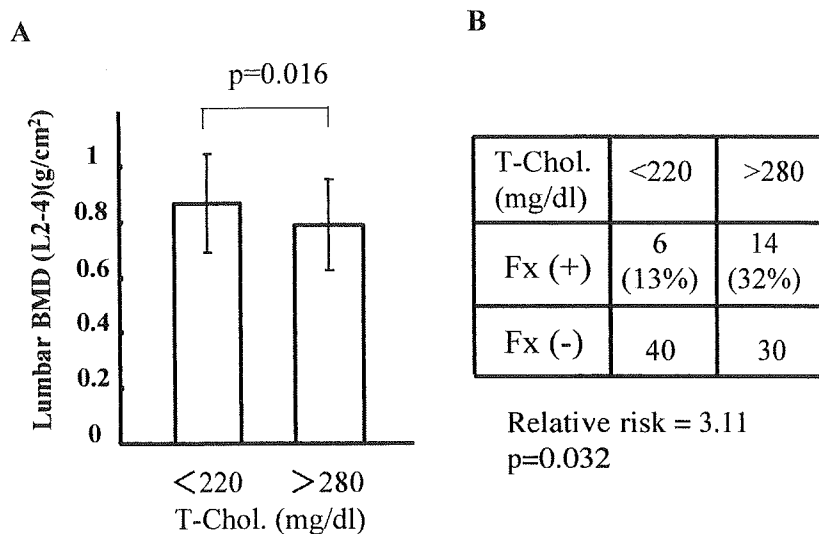


Figure 3. Influence of hyperlipidemia on lumbar BMD and vertebral fracture (Fx) in high dose glucocorticoid users. (A) Comparison of lumbar BMD between patients with high (> 280 mg/dl) and with normal (< 220 mg/dl) total cholesterol (T-Chol) values. (B) Comparison of the ratio of vertebral fracture between patients with high (> 280 mg/dl) and with normal (< 220 mg/dl) total cholesterol values. Chi-square analysis revealed that vertebral fracture was more frequent in patients with high total cholesterol level than in those with normal level (relative risk = 3.11, p = 0.032).

mean value of a large-scale Japanese study of primary osteoporosis by Orimo, *et al*, in which the cutoff value for osteoporosis was determined to be 70% of young adult mean¹⁴. There have been arguments about the difference of BMD threshold for fractures between postmenopausal users of glucocorticoids and nonusers. There are reports showing the BMD distribution of patients with vertebral fractures was similar for glucocorticoid users and nonusers^{19,20}. On the other hand, other studies found that postmenopausal women taking glucocorticoids had a higher risk of fracture compared with nonusers, even at comparable levels of BMD^{11,21}. Although our study was not designed to address this controversy, the relatively high BMD cutoff value, 80% of the young adult mean, for premenopausal women established in our study suggests that BMD alone may not be suf-

ficient for predicting the risk of vertebral fracture for premenopausal users of glucocorticoids.

This notion is supported by our finding that premenopausal glucocorticoid users frequently experienced complications of vertebral fracture even when they registered normal BMD values. Vertebral fracture was seen in as many as 43% of premenopausal glucocorticoid users even when their BMD values were not particularly low (T score > -1). Recent guidelines from Europe and North America have been developed to establish intervention thresholds for glucocorticoid induced osteoporosis in patients with high BMD levels^{22,23} or regardless of BMD level²⁴. The recent guidelines of the American College of Rheumatology advocate intervention for all patients whose therapy calls for use of > 5 mg/day glucocorticoid for at least 3 months, and for

patients on a longterm glucocorticoid regimen with a BMD below a T score of -1.0 ²². Guidelines from the UK advocate an intervention threshold at a T score of -1.5 for patients who are scheduled to be given > 7.5 mg/day glucocorticoid for at least 6 months²³. Our results suggest the need for developing a new therapeutic approach to prevent glucocorticoid induced osteoporosis in addition to starting antiresorptive therapy at high BMD thresholds.

Accumulating findings indicate that BMD is not the only factor that affects the risk of vertebral fracture^{1,12,25}. One mechanism for the rapid onset of fracture risk could be osteocyte apoptosis, which leads to a deterioration of bone quality and a rapid increase in fracture risk¹⁰. Osteocyte apoptosis is prevalent in glucocorticoid induced osteoporosis²⁶. The network of osteocytes is thought to detect micro-damage to bone and be involved in bone repair remodeling. Therefore, osteocyte apoptosis together with glucocorticoid induced suppression of osteoblast generation could lead to growing micro-damage and a resultant increase in bone fragility. Thus, it is important to develop a new method to estimate bone fragility besides BMD measurement.

Another candidate factor that may contribute to the risk of osteoporosis from our study is hyperlipidemia. Our results showed that high total cholesterol (> 280 mg/dl) may be a risk factor for low BMD and vertebral fracture. There are reports of *in vitro* studies suggesting that low density lipoprotein oxidation products could promote osteoporosis by inhibiting osteoblast differentiation and by directing progenitor marrow stroma cells to undergo adipogenic instead of osteogenic differentiation^{27,28}. Although these *in vitro* studies imply the possible involvement of lipid metabolism in the process of osteoporosis, there has been no report confirming the relationship of hyperlipidemia and glucocorticoid induced osteoporosis, and many clinical trials examining the efficacy of HMG-CoA reductase in preventing osteoporosis have had negative results. Therefore, further investigation is needed to establish a therapeutic strategy for preventing glucocorticoid induced osteoporosis in patients with hyperlipidemia.

Some reports stress the importance of daily glucocorticoid dose (mean) over cumulative glucocorticoid dose as an effective predictor of fracture^{4,5,11}, while others stress cumulative rather than daily glucocorticoid dose^{6,7}. We detected no statistically significant difference between the occurrence of fracture and the mean daily glucocorticoid dose ($p = 0.483$) or cumulative glucocorticoid dose ($p = 0.794$), probably because of the limitation of our cross-sectional study and the limited numbers of patients with fracture. An important factor affecting our results may be differences in the use of antiresorptive drugs, especially bisphosphonates. This may be due partly to the Japanese legislative environment, since prophylactic use of drugs has not been allowed yet in the Japanese health insurance system. As this is a cross-sectional study, there are some limitations

to interpreting our results. The onset of vertebral fracture is not predictable in prevalent fracture cases, and in these cases the influence of BMD may be different from that in incident fracture cases. To address these questions, we are now conducting a randomized cohort trial on patients who start glucocorticoid administration at a high dose, > 0.5 mg/kg.

Our findings support the hypothesis that treatment with glucocorticoids influences the occurrence of vertebral fracture by means of a mechanism independent of BMD. Moreover, it will be necessary to develop a new approach to assess and reduce the risk of vertebral fracture in premenopausal users of glucocorticoids.

ACKNOWLEDGMENT

The authors express their thanks to Drs. Yoshinori Kogata, Sahoko Morinobu, and Tomoko Nakamura and to Nobuhide Hayashi for their assistance with the statistical analysis of bone mineral density data.

REFERENCES

1. Van Staa TP, Leufkens HGM, Cooper C. The epidemiology of corticosteroid-induced osteoporosis: a meta-analysis. *Osteoporos Int* 2002;13:777-87.
2. Cooper C, Coupland C, Mitchell M. Rheumatoid arthritis, corticosteroid therapy and hip fracture. *Ann Rheum Dis* 1995;54:49-52.
3. Hooyman JR, Melton LJ 3rd, Nelson AM, O'Fallon M, Riggs BL. Fractures after rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1984;27:1353-61.
4. Van Staa TP, Leufkens HGM, Abenhaim L, Zhang B, Cooper C. Use of oral corticosteroids and risk of fractures. *J Bone Miner Res* 2000;15:993-1000.
5. Van Staa TP, Leufkens HGM, Abenhaim L, Zhang B, Cooper C. Fractures and oral corticosteroids: relationship to daily and cumulative dose. *Rheumatology Oxford* 2000;39:1383-9.
6. Walsh LJ, Wong CA, Osborne J, et al. Adverse effects of oral corticosteroids in relation to dose in patients with lung disease. *Thorax* 2001;56:279-84.
7. Dykman TR, Gluck O, Murphy WA, Hahn TJ, Hahn BH. Evaluation of factors associated with glucocorticoid-induced osteopenia in patients with rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 1985;28:361-8.
8. Canalis E. Mechanisms of glucocorticoid action in bone: Implications to glucocorticoid induced osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:3441-7.
9. Sambrook P, Lane NE. Corticosteroid osteoporosis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2001;15:401-13.
10. Manolagas SC. Corticosteroids and fractures: a close encounter of the third cell kind [editorial]. *J Bone Miner Res* 2000;15:1001-5.
11. Van Staa TP, Laan RF, Barton IP, Cohen S, Reid DM, Cooper C. Bone density threshold and other predictors of vertebral fracture in patients receiving oral glucocorticoid therapy. *Arthritis Rheum* 2003;38:3224-9.
12. Luengo M, Picado C, Del Rio L, Guanabens N, Montserrat JM, Setoain J. Vertebral fractures in steroid dependent asthma and involutional osteoporosis: a comparative study. *Thorax* 1991;46:803-6.
13. Genant HK, Grampp S, Gluer CC, et al. Universal standardization for dual X-ray absorptiometry: patient and phantom cross-calibration results. *J Bone Miner Res* 1994;9:1316-7.
14. Orimo H, Sugioka Y, Fukunaga M, et al. Diagnostic criteria of primary osteoporosis. The Committee of the Japanese Society for Bone and Mineral Research for Development of Diagnostic Criteria

- of Osteoporosis. *J Bone Miner Metab* 1998;16:139-50.
15. Guidelines Subcommittee. 1999 World Health Organization—International Society of Hypertension guidelines for the management of hypertension. *J Hypertens* 1999;17:151–83.
 16. The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2003;26:S5-20.
 17. Hata Y, Mabuchi H, Saito Y, et al. Report of the Japan Atherosclerosis Society guidelines for diagnosis and treatment of hyperlipidemia in Japanese adults. *J Atheroscler Thromb* 2002;9:1-27.
 18. Nakayamada S, Okada Y, Saito K, Tanaka Y. Etidronate prevents high-dose glucocorticoid-induced bone loss in premenopausal individuals with systemic autoimmune diseases. *J Rheumatol* 2004;31:163-6.
 19. Selby PL, Halsey JP, Adams KRH, et al. Corticosteroids do not alter the threshold for vertebral fracture. *J Bone Miner Res* 2000;15:952-6.
 20. Naganathan V, Jones G, Nash P, Nicholson G, Eisman J, Sambrook PN. Vertebral fracture risk with long-term corticosteroid therapy. *Arch Intern Med* 2000;160:2917-22.
 21. Peel NFA, Moore DJ, Barrington NA, Bax DE, Eastell R. Risk of vertebral fracture and relationship to bone mineral density in steroid treated rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1995;54:801-6.
 22. American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Glucocorticoid-Induced Osteoporosis. Recommendations for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Arthritis Rheum* 2001;44:1496-503.
 23. Bone and Tooth Society of Great Britain, Royal College of Physicians, and National Osteoporosis Society. Guidelines on the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. London: Royal College of Physicians; 2003.
 24. Adachi JD, Olszynski WP, Hanley DA, et al. Management of corticosteroid-induced osteoporosis. *Semin Arthritis Rheum* 2000;29:228-51.
 25. Johnell O, de Laet C, Johansson H, et al. Oral corticosteroids increase fracture risk independently of BMD [abstract]. *Osteoporosis Int* 2002;13 Suppl 1:S14.
 26. Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt M, Manolagas SC. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids: potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J Clin Invest* 1998;102:274-82.
 27. Parhami F, Demer LL. Arterial calcification in face of osteoporosis in ageing: can we blame oxidized lipids? *Curr Opin Lipidol* 1997;8:312-4.
 28. Parhami F, Jackson SM, Tintut Y, et al. Atherogenic diet and minimally oxidized low density lipoprotein inhibit osteogenic and promote adipogenic differentiation of marrow stroma cells. *J Bone Miner Res* 1999;14:2067-78.

原 著

両側の肺空洞病変にアスペルギルス感染を合併し抗真菌薬、 ミカファンギンとイトラコナゾールの併用療法が有効で あった Wegener 肉芽腫症の一例

遠藤 平仁¹ 吉田 秀¹ 近藤 啓文¹
久米 光² 野村 友清³

¹北里大学医学部膠原病・感染内科

²北里大学医学部病理学講座

³国立国際医療センター呼吸器外科

〔受付2月14日、2005年、受理11月24日、2005年〕

要 旨

活動性の Wegener 肉芽腫症の肺空洞病変にアスペルギルス感染を生じた症例を経験した。40歳代男性。Wegener 肉芽腫症、ステロイド、免疫抑制薬による加療中に両側肺空洞病変にアスペルギルス感染を生じた。腎機能障害のためアンホテリシン B の継続投与ができず、またミカファンギン単独投与では効果不十分であった。しかしミカファンギンとイトラコナゾールの併用療法により菌塊が縮小し、空洞辺縁部の浸潤影が改善し病変部位を切除し得た。重症かつ難治性深在性真菌感染症に対して作用機作の異なる抗真菌薬の併用療法の有効性に関する知見はまだ数少ないが、本例ではミカファンギンとイトラコナゾールの併用が有効であった。

Key words: アスペルギルス (aspergillosis), イトラコナゾール (itraconazole), ミカファンギン (micafungin), 併用療法 (combination therapy), Wegener 肉芽腫症 (Wegener's granulomatosis)

はじめに

膠原病などの自己免疫疾患は副腎皮質ステロイド薬や免疫抑制薬を用いるため、経過中深在性真菌症などの日和見感染症を続発する頻度が高く、基礎疾患の治療継続上、重大な問題となる^{1,2)}。とくにアスペルギルスを起因菌とする深在性真菌症は診断が困難であるとともに難治性であり、ときに侵襲性アスペルギルス症として基礎疾患以上に生命を脅かす合併症となる³⁾。膠原病は内臓合併症を伴う全身性疾患であることから、治療に用いる抗真菌薬の副作用が生じやすく抗真菌薬の十分な用量が投与困難な場合がある。このような難治性深在性真菌症に抗真菌薬の併用療法が推奨されている^{4,5)}。

今回、副腎皮質ステロイド薬と免疫抑制薬投与により加療中の Wegener 肉芽腫症の両側肺空洞病変にアスペルギルス感染を合併し、抗真菌薬単剤治療では、副作用あるいは効果不十分のため治療に難渋し抗真菌薬の併用投与を試みた症例を経験したので報告する。

症 例

40歳代男性

主 訴：発熱、血痰、両側耳下腺腫脹

現病歴：2001年11月より左耳聴力低下、湿性咳嗽が出現した。2002年1月より39°Cの発熱が持続し近医受診し胸部異常陰影を指摘され入院した。抗生剤の投与でも改善せず陰影も拡大し両側耳下腺腫脹、血痰、体重減少も認めるようになったため同年2月21日当院に転院した。既往歴、家族歴に特記すべきことはない。

入院時現症：身長169cm、体重53.5kg、体温38.5°C、血圧114/70mmHg、脈拍78/分、意識清明、両側難聴を認める。貧血、黄疸なし、両側耳下腺、顎下腺腫脹、両側肺湿性ラ音聴取、左中下肺呼吸音減弱。心雑音なし。腹部異常なし、皮膚異常なし、四肢浮腫なし、関節炎なし。

検査所見：尿蛋白1+、血尿2+、血液ガスpH7.4、PaCO₂46mmHg、PaO₂63mmHg、血算：白血球数(WBC)11,400/ μ l、Hb7.3g/dl、血小板75.5万/ μ l、生化学はGOT56IU/l、GPT15IU/l、ALP1,042IU/l、BUN18mg/dl、Cr0.59mg/dl、CRP16.3mg/dl、IgG2,018mg/dl、IgA777mg/dl、IgM54mg/dl、ANAx40、PR3-ANCA13EU、C-ANCAx8陽性、P-ANCA-

臨床経過：胸部単純レントゲン(Xp)及びCTで、左上肺野から中肺野に空洞を伴う浸潤影及び右上肺野に浸潤

別刷請求先：遠藤 平仁

〒228-8555 神奈川県相模原市北里1-15-1

北里大学医学部膠原病感染内科

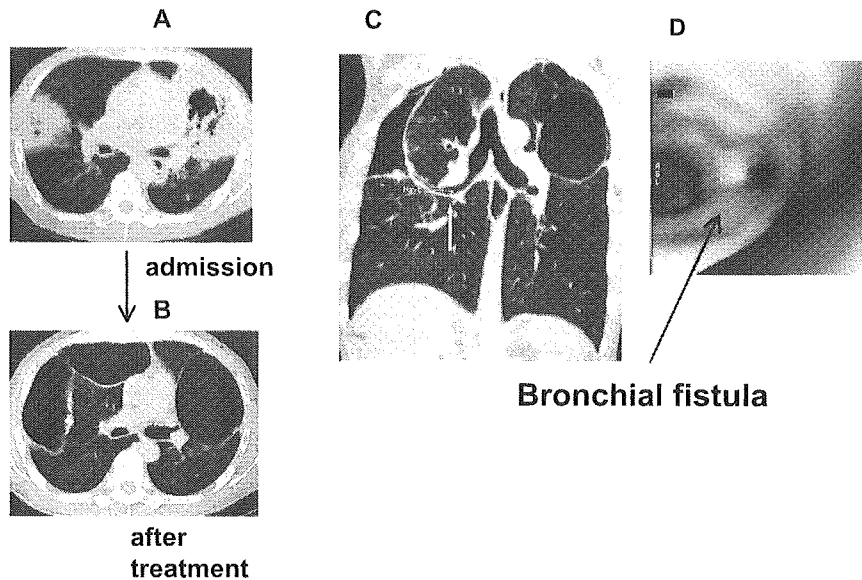


Fig. 1. A. Before treatment : Chest CT (March 6. 2002) Before drug therapy there were numerous nodular lesions in bilateral lungs of the patient with Wegener's granulomatosis.
 B. After treatment : Chest CT (June 6. 2002) Giant cavities remained in the superior lobe in both lungs.
 C. Chest CT (September 6. 2002); bronchial fistula: arrow⇒
 D. 3D CT (September 6. 2002); bronchial fistula: arrow →

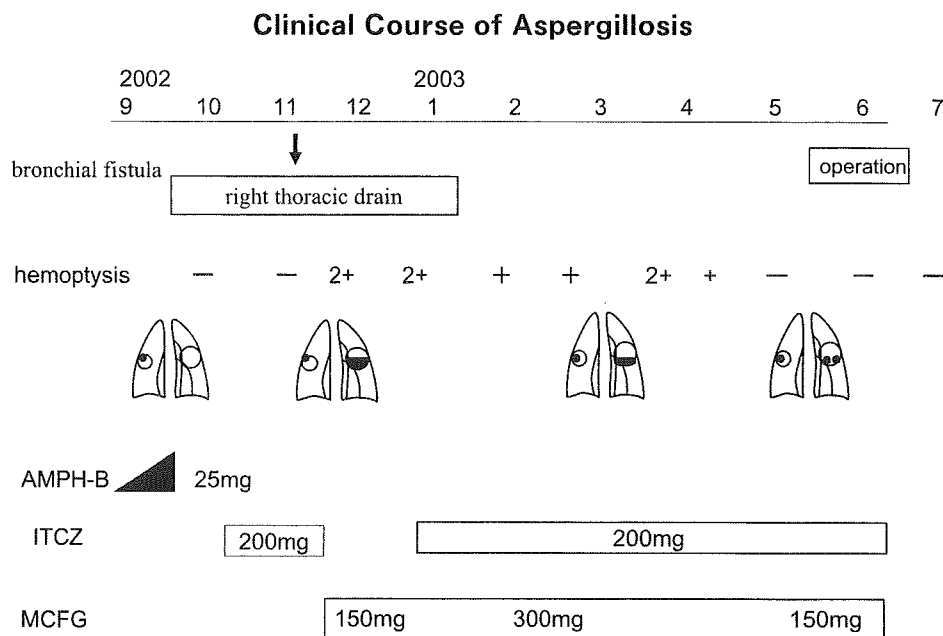


Fig. 2. Clinical course of aspergillosis in the patient
 ↓:OK-432 infusion into the right pleural cavity, AMPH-B: Amphotericin B, ITCZ: Itraconazole, MCFG: Micafangin

影を認めた (Fig. 1A). 経気管支肺生検上、腫瘤部は巨細胞を伴う肉芽腫と中心部の壊死組織の所見を認めた。また生検上耳下腺にも肉芽腫病変を認めた。C-ANCA 陽性で上気道、下気道の肉芽腫病変の存在と、尿蛋白、尿潜血陽性より Wegener 肉芽腫症と診断した。メチルプレドニゾン 1g 3日間のステロイドパルス療法とシクロホスファミド 50mg/日の投与により CRP 23から 0.2 mg/dl, WBC 10,200から 8,700/mm³と減少し、発熱、

血痰等の症状も改善した。両側肺に治癒後の空洞状嚢胞を残した状態となった (Fig. 1B)。右空洞病変が穿孔し右気胸を発症、胸腔ドレーン挿入するも改善を認められず胸膜癒着術を施行した。しかし14日後激しい咳嗽を認め再び右気胸を発症した。保存療法にても改善無く右肺気管支瘻を疑った (Fig. 1C)。右胸腔ドレーン留置を継続し原疾患の治療を継続していた。

アスペルギルス合併後の経過 (Fig. 2)。8月20日右胸

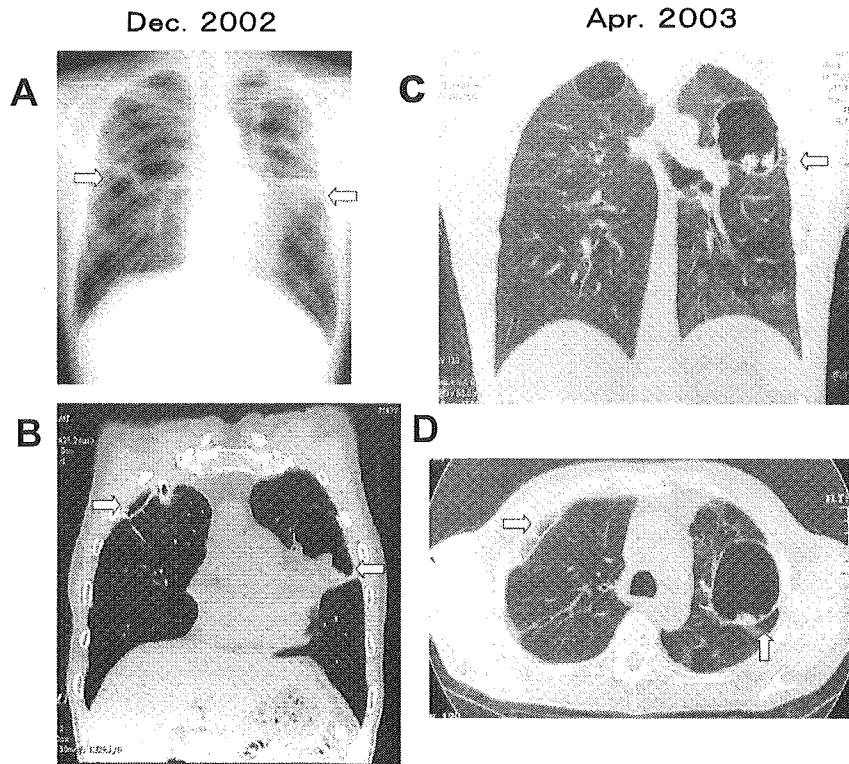


Fig. 3. A. Infiltrating shadow in bilateral cavities. Cavity in left lung shows high air fluids levels (December 9, 2002). B. Chest CT longitudinal section image (December 15, 2002): arrows ⇒: aspergilloma C. Chest CT longitudinal section image (April 14, 2003): A spherical mass shadow is visible in the left cavity, but there is no hyperplasia of the cavity wall after treatment. D. Chest CT axial (April 14, 2003): A small mass lesion is left in left pleural cavities after antifungal treatments. arrow ↓: aspergilloma

腔ドレーンより血性浸出液が出現し、浸出液の真菌培養より *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) を検出した。ドレーンが抜去できずアンホテリシン B (AMPH-B) 1 mg/日の投与を施行、以後漸増投与をおこなった。しかし6日後 AMPH-B 25 mg/日投与後、血清クレアチニン値 1.9 mg/dl に上昇 (AMPH-B 投与前 0.8 mg/d) したことから AMPH-B による腎機能障害と診断した。以後 AMPH-B の投与を中止したがドレーン排液の培養で再度 *A. fumigatus* が検出された。イトラコナゾール (ITCZ) 200 mg の経口投与を行い、CRP は陰性化し、胸膜癒着療法 (抗悪性腫瘍溶連菌製剤 (OK-432) 10KE を胸腔ドレーンに注入) を施行するも効果なく、7日後再び発熱、血痰も認められた。胸部 X-p 上左肺空洞にニポーの形成が確認されたことから、気管支瘻を通じ左肺空洞病変に *A. fumigatus* が感染したと診断した (Fig. 3A, B)。ITCZ 投与を継続するも発熱、血痰、胸部 Xp 写真に変化なく喀痰培養でも *A. fumigatus* が分離されたことから ITCZ の治療効果が乏しいと診断した。12月5日よりミカファンギン (MCFG) 150 mg の投与に変更、2週間投与したが臨床症状の改善なく、300 mg に増量してさらに3週間投与するも炎症反応、胸部 Xp 及び CT 画像上ニポー像は変化せず、MCFG 単剤投与では効果不十分と判断した。発熱、炎症反応の上昇、血痰の咯出が頻回になったことから ITCZ 200 mg の併用を行った。

一時的に、細菌 (MRSA) 混合感染、敗血症を合併し抗生剤投与を行った。MCFG と ITCZ との併用投与は炎症反応や胸部 Xp 上の所見を改善した (Fig. 3C, D)。

MCFG と ITCZ の併用は84日間継続したが血清コレステロール値上昇以外の副作用の発現は無かった。なお、投与中の ITCZ 200 mg 経口投与の血中濃度は 421 ng/ml (HPLC 測定: ITCZ+ITCZ-OH) であった。Wegener 肉芽腫症の病状は安定し、プレドニゾロン (PSL) 10 mg/日より漸減して 5 mg/日の投与を継続すると共に免疫抑制剤の投与は中止した。胸部 CT 上左空洞のアスペルギルス病変は空洞内ニポーを形成していた (Fig. 3B)。治療後 CT 画像上空洞内アスペルギルスは球状、結節状に変化し (Fig. 3C, D)、血痰は減少、炎症反応も CRP 1.0 mg/ml まで低下した。全身状態は安定し、PSL も 5 mg/日投与まで減量しえたことから、手術療法が可能な全身状態と判断した。今後 Wegener 肉芽腫症増悪時菌塊が残存したままではステロイド大量投与などを行うことができないと考え手術療法適応とし、7月17日他院外科に転院した。細径気管支鏡にて左空洞内容物の培養で *A. fumigatus* を検出した。7月25日、左上葉切除術を施行しアスペルギルスの真菌塊を切除した。また9月8日右開胸術を施行、葉間に真菌塊を認め、摘出し、葉間に大胸筋、肋間筋を充填し9月26日退院した。その後 ITCZ 200 mg 単剤投与を3か月継続した後すべて

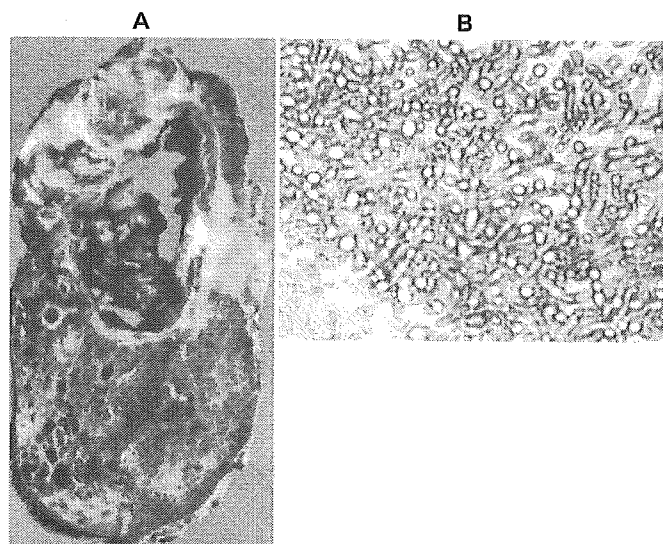


Fig. 4. A. Pathological findings of upper lobe of the left lung. This lobe is occupied by a cavity with a fibrous wall. There were many fungal nodules in this cavity.
B. Histopathological findings of nodular lesion in the left lung cavity. Hyphae of the aspergillosis show frequent transverse septa and exhibit dichotomous branching at acute angles. $\times 400$

の抗真菌薬を中止するも検査上炎症反応なく、胸部Xp上変化なく、アスペルギルス症の再発は認めていない。手術病理組織所見（7/25左上葉切除手術）：左肺上葉に真菌塊を含む9×4 cm大の空洞形成を認めた。真菌塊は鋭角に分枝する有節性糸状菌の塊で、アスペルギルスの菌塊と判断された。空洞外へのアスペルギルスの浸潤は認められなかった（Fig. 4A, B）。

なお本症例の画像、病理所見に関する情報は研究に用いることに関する同意を得ている。

考 察

膠原病などの自己免疫疾患は副腎皮質ステロイド薬、免疫抑制薬を治療薬として使用するため、深在性真菌症の合併は治療の継続を困難にし、生命を脅かす存在となる。アスペルギルス症は近年、日和見感染の一つとして増加しており侵襲性に全身に感染する症例の予後は悪く救命率も低い。AMPH-Bは*A. fumigatus*に対して殺菌的に作用するゴールドスタンダードの薬剤である。しかし腎毒性をはじめとする多様な副作用があり、投与中止を余儀なくされる。アゾール系抗真菌薬の単独使用効果は病勢のついた侵襲性アスペルギルス感染症については不十分である⁶⁾。

キャンデイン系抗真菌薬MCFGは細胞壁1,3- β -D glucan合成系への選択的阻害薬であり*A. fumigatus*に対しては発芽及び菌糸の伸長を抑制するが殺菌作用はない⁷⁻⁹⁾。MCFGは臨床的に難治性真菌症に有効性が報告されており¹⁰⁾、また長期投与でも顕著な副作用はなく作用機序の違いから他の抗真菌薬との併用投与療法の有効性が示唆されている。二木らは*In vitro*の実験で、MCFGは*A. fumigatus*に対してAMPH-Bとの併用では67%の株で、またITCZとの併用では87%の株で相加性以上の

併用効果を認めた。さらにマウス肺アスペルギルス症モデルに対してMCFGとAMPH-Bとの*in vivo*併用効果を検討し、MCFG 1 mg/kgとAMPH-B 0.25 mg/kgとを併用したとき、その2倍用量であるMCFGの2 mg/kg、あるいはAMPH-B 0.5 mg/kgのそれぞれ単独投与時と比較して、併用による治療効果が相乗的であることを報告している¹¹⁾。本症例はWegener肉芽腫症の両側肺空洞病変に*A. fumigatus*が感染した。プレドニゾロン、シクロホスファミドの投与を継続する必要がある、また全身状態が悪く容易に手術療法に踏み切れず、薬物療法にて真菌増殖を抑制する必要があった。AMPH-Bは腎障害のため十分な投与が不可能であり、ITCZ 200 mgは有効血中濃度に達していたが効果が不十分で、またMCFGも最大量300 mgを1か月間投与するも効果が不十分であった。MCFG 300 mgとITCZ 200 mgの併用で血痰の減少、画像上の改善傾向がみられ、臨床的に手術療法の適応域に達したと判断され施行し得た。難治性深在性真菌感染症に併用療法が示唆されてはいるが実際にヒトの症例における報告は少ない。今回単剤で無効であった症例で、MCFGと作用の異なるITCZとの併用療法が有効であった。

MCFGとAMPH-B MCFG、またはMCFGとアゾール系抗真菌薬の相乗効果が示唆されている^{12, 13)}が、一方アゾール系抗真菌薬とAMPH-Bの間には*in vitro*、および*in vivo*での拮抗作用が認められることが報告されている¹⁴⁾。

症例はAMPH-Bによる腎障害の発現から投与を中止せざるを得ず、AMPH-B 10 mgとMCFGとITCZの併用療法によって初めて*A. fumigatus*の増殖を抑制することができた。また同時に原疾患のWegener肉芽腫症に対する副腎皮質ステロイド薬やシクロホスファミドなどの

免疫抑制療法の漸減が可能になったことによる免疫機能の回復も感染性炎症所見の制御に結びつき、最終的には根治が可能になったと思われる。

結 語

活動性 Wegener 肉芽腫の両側肺空洞病変にアスペルギルス感染を合併した症例に、MCFG と ITCZ の併用療法を試み、その有効性が示唆されるとともに副作用の発現は認めなかった。重篤な深在性真菌感染に対して多臓器障害を伴い抗真菌薬の単剤療法が効果不十分な症例では、作用の異なる抗真菌薬の併用療法も治療選択の一つであることを改めて指摘したい。

文 献

- 1) 河野 茂: Compromised host における深在性真菌症. *Jpn J Med Mycol* **41**: 71-76, 2000.
- 2) 久米 光: 内臓真菌マニュアル. 久米 光編, ライフリサーチプレス, 1994.
- 3) 深在性真菌症の診断と治療のフローチャート解説: 呼吸器内科領域, 23-25, 深在性真菌症の診断, 治療ガイドライン第1版. 深在性真菌症ガイドライン作成委員会編, 医歯薬出版 2003.
- 4) George D, Korfflick D, Minitier P, *et al.*: Combination therapy in experimental invasive aspergillosis. *J Infect Dis* **168**: 692-698, 1993.
- 5) Robinson RF, Nahata MC: A comparative review of conventional and lipid formulations of amphotericin B. *J Clin Pharm Ther* **24**: 249-257, 1999.
- 6) Stevens DA, Kan VL, Judson MA, *et al.*: Practise guidelines for diseases caused by *Aspergillus*. *Clin Infect Dis* **30**: 696-709, 2000.
- 7) Tomishima M, Ohki H, Yamada A, *et al.*: FK463, a novel water-soluble echinocandin lipopeptide: synthesis and antifungal activity. *J Antibiotics* **52**: 674-676, 1999.
- 8) 河野 茂, 山口英世: ミカファンギン (MCFG) の概要. *日本化学療法学会雑誌* **50S-1**: 1-7, 2002.
- 9) 池田文昭, 大友寿美, 中井 徹, 森下佳彦, 牧 克之, 俵修一, 武藤誠太郎, 松本文夫, 桑原章吾: Micafungin の *in vitro* 抗真菌活性. **50S-1**, 8-19, 2002.
- 10) 野々山勝人, 久米 光, 熊谷 謙, 相馬一玄, 砂川慶介: Micafungin が有効であった *Candida krusei* の一例. *感染症学会誌* 982-985, 2003.
- 11) 二木芳人, 吉田耕一郎, 松島敏春, 中島正光, 中井 徹, 大友寿美, 若井芳美, 松本 哲, 波多野和男, 池田文昭, 武藤誠太郎: Micafungin と amphotericin B, itraconazole および fluconazole および fluconazole との併用効果. *日本化学療法学会雑誌* **51S-1**, 58-67, 2002.
- 12) Harai S: Current strategies in the treatment of invasive *Aspergillus* infections in immunocompromised patients. *Drugs* **58**: 621-631, 1999.
- 13) Polak A: Combination therapy for systemic mycosis infection **17**: 203-209, 1989.
- 14) Maesaki S, Kohno S, Kaku M, Koga H, Hara K: Effects of antifungal agent combinations administered simultaneously and sequentially against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemist*, 2843-2845, 1994.

Combined Effect of Micafungin and Itraconazole on Severe Aspergillosis of the Bilateral Pleural Cavities in a Patient with Wegener's Granulomatosis

Hirahito Endo¹, Hide Yoshida¹, Hirobumi Kondo¹
Hikaru Kume², and Tomokiyo Nomura³

Kitasato University School of Medicine, ¹Department of Internal Medicine, ²Department of Pathology,
1-15-1 Kitasato, Sagami-hara, Kanagawa 228-8555, Japan

³Department of Thoracic Surgery, International Medical Center of Japan
1-21-1 Toyama, Shinjyuku, Tokyo 162-8655, Japan

Visceral fungal infections are difficult to manage in patients with collagen diseases and immunocompromised hosts. In particular aspergillosis can be a life-threatening complication in these patients. Here we report that combined use of two antifungal agents (micafungin and itraconazole) was effective against severe aspergillosis of the bilateral pleural cavities in a 48-year old male patient diagnosed with Wegener's granulomatosis. Immunosuppressive therapy with corticosteroids and cyclophosphamides improved his nasal and pulmonary symptoms, but inflammation of the bilateral pleural cavities caused bronchial fistulas. *Aspergillus fumigatus* then infected the bilateral pulmonary cavities through these fistulas. This patient was treated with combined therapy of ITCZ and MCFG was given to this patient because of the risk of renal dysfunction associated with AMPH-B. After 5 weeks of treatment his clinical findings had improved and the fungus was suppressed.

Rheumatology 2005;44:1462–1464
doi:10.1093/rheumatology/kei075
Advance Access publication 16 August 2005

Extremely high titer of anti-human chimeric antibody following re-treatment with rituximab in a patient with active systemic lupus erythematosus

SIR, In a recent issue and elsewhere [1, 2] we reported five cases of life-threatening refractory systemic lupus erythematosus (SLE). In May 2004, one of the patients had a flare-up after 18 months' remission and infusion of rituximab was employed again. However, it did not reduce disease activity because of the development of anti-human chimeric antibody (HACA) against rituximab. There is growing evidence for the efficacy of rituximab in refractory SLE [1–5]. However, prevention of production of HACA could become important for successful treatment of SLE with rituximab. Little is known about HACA in SLE at present. We present our case in detail and also describe the characteristic features associated with the development of HACA in autoimmune disease.

A 35-yr-old woman was diagnosed with SLE in 1991 and had been treated since then with repeated steroid pulses, intravenous cyclophosphamide infusion and cyclosporin A. However, her level of consciousness deteriorated to stupor because of involvement of the central nervous system (CNS), with an extremely high titer of anti-dsDNA antibody in June 2002 despite intensive conventional therapies. Finally, a decision was made to treat the patient with the anti-CD20 monoclonal antibody rituximab, which is known to be highly effective against *in vivo* B-cell depletion, based on the consideration that the serious status of CNS lupus was mainly due to autoantibodies from activated B lymphocytes. Just 2-weekly infusions of rituximab ($375/\text{m}^2$ of body surface area) resulted in dramatic recovery from her catastrophic status, and the patient became fully alert with significant improvement of proteinuria being noted at day 30. In addition, anti-dsDNA antibody and complement levels returned to normal at day 90. It is noteworthy that the above improvement of clinical signs, symptoms and laboratory findings remained normal and the SLEDAI (SLE disease activity index) was less than 2 points even after tapering of betamethasone. The above treatment allowed the patient to go back to her job within 6 months of her life-threatening status.

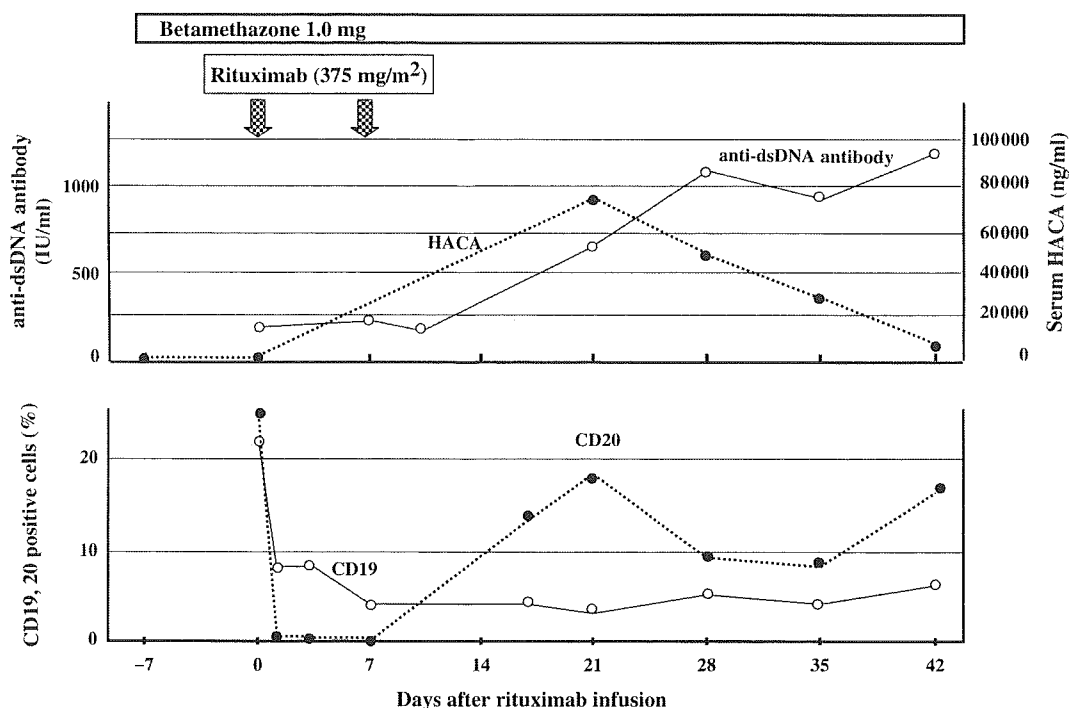


FIG. 1. Clinical course and response to treatment with rituximab. Rituximab was administered at 375 mg/m² body surface area twice weekly at the indicated hatched arrows, together with 1 mg of betamethasone. Top graph: anti-dsDNA antibody (open circles) and human anti-chimeric antibody (HACA; closed circles) examined by enzyme-linked immunosorbent assay. Bottom graph: expression of CD19 (open circles) and CD20 (closed circles) on peripheral lymphocytes as determined by flow cytometric assay.

After about an 18-month remission, SLE flare-up occurred in July 2004 with a rise in anti-dsDNA antibody titer, hypocomplementaemia, lymphocytopenia and high positivity of CD19 cells (21.7% of white blood cells) and CD20 (25.4%). After the infusion of rituximab, almost all CD20 molecules on B cells are consistently saturated with rituximab without any internalization. Therefore we also observed CD19, which is also exclusively expressed on B cells, to evaluate the depletion of B cells. Although 2-weekly infusion of 375/m² of body surface area of rituximab was administered, it did not resolve disease activity and anti-dsDNA antibody progressively increased to 1244 IU/ml as shown in Fig. 1. The severity of proteinuria worsened to 2 g/day and more than 4% CD19-positive lymphocytes were still noted after rituximab infusion, while CD20-positive cells were detected only 10 days after the second infusion of rituximab. We considered the possible development of HACA against rituximab and examined the blood concentration of rituximab and HACA. The blood concentration of rituximab was lower than the detectable level (0.1 µg/ml) on 21, 28 and 35 days after initial infusion as well as just before the rituximab infusions. Furthermore, an extremely high titre of HACA against rituximab was detected even just after rituximab infusion.

Rituximab is a genetically engineered chimeric murine variable regions/human IgG1 anti-CD20 monoclonal antibody [6]. Recent studies have shown that rituximab is effective for SLE as well as haematological malignancies [1–5]. Regarding the mechanism of action of rituximab in SLE, we provided evidence that rituximab not only reduces B-cell numbers by *in vivo* deletion but down-regulates co-stimulatory molecules on B cells, resulting in disturbed T-cell activation [1]. Reduction in both the quantity and quality of B cells suggests that rituximab could improve the disease course in patients with refractory SLE.

Recent studies have reported detection of an autoantibody against rituximab following such treatment [5], and that the detection rate was significantly higher in SLE than in lymphoma patients [5, 7]. Specifically, high-titre HACAs were detected in

six of 17 SLE patients [5] but in only one of 166 lymphoma patients [7]. These results suggest that human–mouse chimeric antibodies may be more immunogenic in autoimmune disease, especially in SLE, because of the highly activated B-lymphocyte status.

High titres of HACA in SLE were reported to be associated with disease activity, reduced B-cell depletion, low levels of rituximab and loss of efficacy of rituximab at 2 months after the initial infusion [5]. With regard to the present case, although HACA was not detected just before rituximab infusion, the titre at 3 weeks after the first infusion was one order higher than that reported in a previous paper [5]. Furthermore, serum rituximab could not be detected even at 14 days after the second infusion. These findings suggest prompt development of HACA on the background of extremely high disease activity (SLEDAI = 21 points), resulting in neutralization of rituximab and abolition of the therapeutic effect of rituximab in our patient.

The issue of drug-related antigenicity is not unique to rituximab. In a 26-week phase II study of infliximab, which is also a mouse–human chimeric antibody used to block tumour necrosis factor-α, 21% of rheumatoid arthritis patients treated with standard-dose infliximab (3 mg/kg) developed infliximab-specific HACA. Concomitant therapy with low-dose weekly methotrexate significantly diminished the incidence of HACA [8]. In a more recent cohort study of patients with Crohn's disease treated with serial infusions of infliximab, concomitant immunosuppressive therapy led to a lower incidence of HACA and a more prolonged duration of response. Pre-medication with intravenous hydrocortisone significantly reduced HACA levels but did not eliminate HACA production or infusion reactions [9]. In this regard, Sandborn [10] proposed that one optimization strategy is the use of immunosuppressive therapy for a clinically relevant period of time with azathioprine for 2–3 months or methotrexate for 1.5–2 months prior to initiating infliximab. However, our patient was also on azathioprine prior to the infusion of rituximab to prevent

HACA production, but it resulted in severe granulocytopenia, necessitating discontinuation of the medication.

However, rituximab maintenance therapy is also reported to successfully control SLE. In one such study, two patients were treated with rituximab ($375 \text{ mg/m}^2 \times 4$, repeated at weekly intervals) followed by maintenance therapy with rituximab 375 mg/m^2 every 3 months. At 30 months after the commencement of rituximab therapy, both patients were free of symptoms [4]. Thus, repeated treatment with rituximab seems to induce persistent suppression of B-cell function and reduce the likelihood of development of HACA.

In conclusion, SLE is a representative autoimmune disease characterized by polyclonal activation of B lymphocytes and production of diverse autoantibodies. The frequency of HACA production among SLE patients appears to be high compared with patients with haematological malignancies or other autoimmune diseases. Since the development of HACA results in the negation of a strong weapon against refractory SLE, we must pay attention to the possible development of HACA, especially in the case of re-treatment with rituximab. Concomitant treatment with immunosuppressants or repeated maintenance therapy seems to be a useful strategy to prevent production of HACA. We have to establish a practical strategy to prevent the development of HACA in SLE.

The authors have declared no conflicts of interest.

K. SAITO, M. NAWATA, S. IWATA, M. TOKUNAGA, Y. TANAKA

The First Department of Internal Medicine, University of Occupational and Environmental Health, School of Medicine, 1-1 Iseigaoka, Yahatanishi-ku, Kitakyushu 807-8555, Japan
Accepted 14 July 2005

Correspondence to: Y. Tanaka, The First Department of Internal Medicine, School of Medicine, University of Occupational and Environmental Health, 1-1 Iseigaoka, Yahatanishi, Kitakyushu 807-8555, Japan.
E-mail: tanaka@med.uoeh-u.ac.jp

1. Tokunaga M, Fujii K, Saito K *et al.* Down-regulation of CD40 and CD80 on B cells in patients with life-threatening systemic lupus erythematosus after successful treatment with rituximab. *Rheumatology* 2005;44:176–82.
2. Saito K, Nowata M, Nakayamada S, Tokunaga M, Tsukada J, Tanaka Y. Successful treatment with anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab) of life-threatening refractory systemic lupus erythematosus with renal and central nervous system involvement. *Lupus* 2003;12:798–800.
3. Leandro MJ, Edwards JC, Cambridge G, Ehrenstein MR, Isenberg DA. An open study of B lymphocyte depletion in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2002;46:2673–7.
4. Weide R, Heymanns J, Pandorf A, Koppler H. Successful long-term treatment of systemic lupus erythematosus with rituximab maintenance therapy. *Lupus* 2003;12:779–82.
5. Looney RJ, Anolik JH, Campbell D *et al.* B cell depletion as a novel treatment for systemic lupus erythematosus: a phase I/II dose-escalation trial of rituximab. *Arthritis Rheum* 2004;50:2580–9.
6. Reff ME, Carner K, Chambers S *et al.* Depletion of B-cells in vivo by a chimeric mouse monoclonal antibody to CD20. *Blood* 1994;83:435–45.
7. McLaughlin P, Grillo-Lopez AJ, Link BK *et al.* Rituximab chimeric anti-CD20 antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol* 1998;16:2825–33.
8. Maini RN, Breedveld FC, Kalden JR *et al.* Therapeutic efficacy of multiple intravenous infusions of anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody combined with low-dose weekly methotrexate in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1998;41:1552–63.
9. Farrell RJ, Alsahli M, Jeen YT, Falchuk KR, Peppercorn MA, Michetti P. Intravenous hydrocortisone premedication reduces antibodies to infliximab in Crohn's disease: a randomized controlled trial. *Gastroenterology* 2003;124:917–24.
10. Sandborn WJ. Preventing antibodies to infliximab in patients with Crohn's disease: optimize not immunize. *Gastroenterology* 2003;124:1140–5.

インフリキシマブとニューモシスチス肺炎

田中良哉* 齋藤和義*

抗 TNF- α 抗体インフリキシマブは、RA の治療においてきわめて高い有用性を示し、治療目標を寛解導入や関節破壊進行制御に変えてしまった。一方、免疫抑制作用による結核をはじめとする日和見感染症の発症が問題視されたが、欧米ではほとんど認められなかったニューモシスチス肺炎は、わが国での市販後調査 4,000 例中 15 例 (0.38%) に認められ、結核の発症数を上回った。ニューモシスチス肺炎による致死率は早期診断に依存し、ST 合剤による適切な加療がおこなわれれば治癒できるため、発熱、息切れ、胸痛、乾性咳嗽などの臨床症候につねに留意し、高解像度の CT や誘発喀痰を用いた PCR 診断による早期診断が重要である。

はじめに

ニューモシスチス肺炎は、*Pneumocystis* により引き起こされる日和見感染症である。2003 年 7 月、わが国初の関節リウマチ (rheumatoid arthritis : RA) に対する生物学的製剤抗腫瘍壊死因子- α (tumor necrosis factor- α : TNF- α) キメラ抗体インフリキシマブが市販され、強力な疾患活動性抑制効果が実証された。一方、解析が終了した市販後調査 4,000 例中 15 例 (0.38%) にニューモシスチス肺炎の発症が認められ、当初危惧された結核

の発症数をも上回る結果となった。結核に対しては詳細な予防措置が取られたが、ニューモシスチス肺炎に関しては、海外での発症はきわめてまれであることから予防策は確立されず、その策定は急務となってきた。ただ、TNF- α はニューモシスチスの肺胞内でのクリアランスに関与し、その抑制が肺炎の発症につながる可能性は動物実験で十分に予見されていた。本稿では市販後調査において明らかにされたインフリキシマブ投与におけるニューモシスチス肺炎の実態、診療における留意点、早期診断・加療へのポイントを概説する。また、当科では以前より誘発喀痰を用いたニューモシスチスの PCR 法による DNA 診断を導入し、早期診断に役立てており、その有用性を紹介する。

Key Words

関節リウマチ
インフリキシマブ
ニューモシスチス肺炎
一次予防
PCR 診断

* TANAKA Yoshiya, SAITO Kazuyoshi/産業医科大学医学部第一内科学講座

1. ニューモシスチス肺炎概論

1) ニューモシスチス肺炎の病態機構

ニューモシスチスは、Antonio Carinii によりラットの肺で確認され、当時は新種の原虫と考えられ *Pneumocystis carinii* と命名されたが、その後の 16 S R

ボゾームやミトコンドリア DNA の解析により真菌に分類された¹⁾。しかし、ニューモシスチス感染は厳格な宿主選択性を有し、ヒトに感染するニューモシスチスは *Pneumocystis jirovecii* であることが判明し、ニューモシスチス肺炎と改称された。カリニ肺炎は不的確な表現とされる。2~3歳以上の大部分のヒト血清には、抗ニューモシスチス抗体が検出され、集団感染や家族内感染がみられることなどより、幼少時に経気道的に不顕性感染するとされている¹⁾。免疫能低下に伴い潜在するニューモシスチスが再活性化されるとされてきたが、健康人気管支肺胞液やニューモシスチスとは無関係な疾患で死亡した患者剖検検体で、PCR を用いてもニューモシスチスの存在は確認されないこともあり、膠原病の治療中に発症するニューモシスチス肺炎は、むしろ新たな経気道感染にて生じるとされている。

P. jirovecii は表面に glycoprotein A を表出し、I型肺胞上皮により産生されるムチンと親和性を有し、肺胞壁に強固に固着して脱落することなく増殖する。ニューモシスチス肺炎では著しい肺胞-毛細血管における酸素化障害が特徴的であるが、ニューモシスチスの増殖による物理的な被覆で酸素化障害が起こるのではなく、肺胞上皮に固着したニューモシスチスに対して、宿主の免疫応答による局所での炎症が惹起されることにより酸素化障害が生じる。また、細胞壁成分として他の真菌と同様に β -D-グルカン を有し、ニューモシスチス肺炎では一般的に血清 β -D-グルカンが上昇する。一方、他の真菌と異なり細胞増殖にエルゴステロール合成の関与がなく、アンホテリシンやアゾール系の抗真菌薬は無効である。

2) ニューモシスチス感染症の臨床症状

初期の症状は非特異的な全身倦怠感などの全身症状で、その後、乾性咳嗽(1~2週)、労作時息切れ、胸骨後部の tightness (咳、吸気にて増強)などの呼吸器症状が急速に進行して、頻呼吸、安静時経皮的酸素分圧低下を呈する。膠原病に伴うニューモシスチス肺炎は、後天性免疫不全症候群 (acquired immunodeficiency syndrome: AIDS) のときよりも進行が急速である。8~9割において発熱がみられるが必発ではない。低酸素血症は、胸写上の変化に先んじて認められることが多く、胸部単

純撮影においてとくに異常を認めない進行性低酸素血症では、ニューモシスチス肺炎を強く疑って鑑別診断すべきである。通常初期に呼吸音異常はないとされるが、後期には30~40%でラ音が聴取される。

3) ニューモシスチス肺炎の検査所見

ニューモシスチス肺炎ではLDH、CRP、KL-6などが上昇するが、特異性は乏しい。KL-6値は予後とも相関し、治療指標ともなるが、RAによる間質性肺炎、サイトメガロウイルス肺炎やメトトレキサート (MTX) による間質性肺炎でも上昇し、鑑別診断は臨床症状や他の検査所見を勘案しておこなわれる。血清 β -D-グルカン値は、ニューモシスチス肺炎の重症度・治療の効果を評価する際に有用で、低酸素血症や間質性肺炎とともに β -D-グルカンの上昇がみられた際、他の深在性真菌症の除外は必要であるが、積極的にニューモシスチス肺炎を疑う根拠となる²⁾³⁾。

画像診断では、胸部単純X線撮影で典型的には肺門部より蝶型に下肺から上肺野に拡大する間質影を呈するが、胸膜直下や肺門部近傍、肺尖部は温存される。膠原病による間質性肺炎は、背側下肺野より上向性に進行することが多い点で異なるが、鑑別診断はしばしば困難である。胸部CT検査では、胸部単純撮影で異常が認められなくても、びまん性に肺の固質化影や肺胞壁の肥厚像がみられるが、これらの所見の早期検出には高解像度CTが有用であり、ニューモシスチス肺炎が疑われる症例では施行が推奨される。

4) ニューモシスチス肺炎の診断

ニューモシスチス肺炎の診断には、まず疑うことが必要である。①乾性咳嗽、労作時息切れ、発熱などの進行性の臨床症候、②進行性低酸素血症、③胸部X線・胸部CTで間質性肺炎を認めた際、ニューモシスチス肺炎が強く疑われる。診断は患者呼吸器由来検体を鏡検してニューモシスチスの存在を確認することによるが、気管支肺胞洗浄液 (brochoalveolar lavage fluid: BALF) を検体として用いても感度は低く、タイムリーな確定診断は困難である。初発症状は乾性咳嗽であり、初期には良質の喀痰を採取できないことが多い⁴⁾⁵⁾。鏡検に際し

表① インフリキシマブ市販後調査 4,000 症例におけるニューモシスチス肺炎の概要

発症数	15 症例 (0.38%)
平均年齢	65.1 歳 (51~80 歳)
重症度	全例重症
投与開始から発症まで	
投与回数	2.9 回 (1~4 回)
投与日数	74.4 日 (35~168 日)
臨床症状の発現	全例 (発熱, 咳, 呼吸困難など)
臨床検査	
PCR 法	陽性 14 例, 未実施 1 例
β -D-グルカン	345.7 pg/ml (6.5~1,720 pg/ml)
治療	
抗カリニ薬 (ST 合剤など)	15 例 (100%)
ステロイド薬 (パルスを含む)	15 例 (100%)
抗生物質	8 例 (53.33%)
転帰	全例 軽快・回復

て特殊染色が施されるが、染色法により一長一短がある。グロコット染色では、シストを特異的に染色するが虫体総数の大部分を占めるトロフォゾイトは染色されない。ギムザ染色では、シスト、トロフォゾイト両方が染色されるが、宿主組織も染色されるため、虫体の同定がむずかしい。ニューモシスチス抗体を用いた蛍光抗体法も必ずしも診断は容易ではなく、わが国では普及していない。一方、鏡検による診断では、2%食塩水を吸入後に採取する誘発喀痰をサンプルとした場合、50~90%の陽性率が得られることより、検体採取は、まず非侵襲的に誘発喀痰を用いて検査し、これで診断がつかない場合に BALF を採取するように提唱されている⁶⁾。さらに、高感度の検査として PCR を用いた DNA 診断があり、誘発喀痰を用いた迅速診断を当科では実践している (後述)。

2. インフリキシマブに併発したニューモシスチス肺炎 (市販後全例調査結果から)

1) 疫学調査

厚生労働省の指導のもと、インフリキシマブ市販後 5,000 例全例調査が施行され、解析が終了した 4,000 例の報告では、ニューモシスチス肺炎の発症は 15 例 (0.38%)、平均年齢は 65.1 歳で、比較的高齢者に多い傾向を認めた (表①)。細菌性肺炎の発症は 79 例 (1.98%) で、これにくらべ発現率は低いですが、欧米ではニューモシ

スチス肺炎の発症はきわめてまれで、わが国で高頻度に併発する原因は不詳である。また、全例重症と判断されているが、ST 合剤およびパルス療法を含むステロイド大量療法に反応して、全例で軽快・回復している。投与開始から発症までの平均投与回数は 2.9 回 (1~4 回)、平均投与後日数は 74.4 日 (35~168 日) で、細菌性肺炎のように投与数日で発症するような症例はなかった。市販後調査の 4,000 例におけるニューモシスチス肺炎の発症例数の推移は、登録 1~1,000 番までに 6 例の報告後、登録 1,001~2,000 番での発症は 1 例であったが、その後、発症数が増加に転じている。細菌性肺炎では 1,000 番までの登録症例での発症が最多で、その後漸減傾向にあるのと対照的で、更なる情報収集・解析の継続が必要である。

2) インフリキシマブに併発したニューモシスチス肺炎の特徴

動物実験では、TNF- α は好中球、リンパ球、単球の肺胞へのリクルートを促進し、ニューモシスチスの肺胞内でのクリアランスを増加させるが、インフリキシマブ投与による TNF 阻害はニューモシスチスの排除を抑制し、ニューモシスチス肺炎発症に密接に関与する⁷⁾。

インフリキシマブ投与後発症した細菌性肺炎では、14%の症例で発熱、咳嗽、呼吸困難などの臨床症状を呈さなかったのに対し、ニューモシスチス肺炎を生じた患者は全員、臨床症状の発現が確認されている。したがって、このような症状に関する医師の自覚、および患者へ

の説明が早期診断に重要である。また、高齢者、糖尿病や慢性呼吸器疾患などの合併疾患、ステロイド内服量などが宿主の免疫・肺胞内クリアランスの低下をもたらす、ニューモシスチス肺炎発症に関与することが推定されるが、症例の蓄積と詳細な解析を要する。

市販後調査での発症例の血清 β -D-グルカン平均値は、345.7 pg/ml (6.5~1,720 pg/ml) と高値で、診断の傍証として重要な所見である。ただし、ニューモシスチス肺炎の確定診断例でも、発症早期には β -D-グルカンは正常上限で数日後に高値となった症例も存在し、このような症例では β -D-グルカンの再検と臨床症状を重視し HRCT を施行する重要性が再認識される。

ニューモシスチスの β -D-グルカンは肺胞マクロファージを刺激し TNF- α 産生を誘導し、局所炎症を惹起し、肺胞での酸素化障害をもたらすため、インフリキシマブによる TNF 阻害は、逆に、炎症を軽減し発症を緩徐進行性にするとも推測された⁹⁾。たとえば、宿主の獲得免疫が著しく低下している AIDS では、大量のニューモシスチスが肺胞に存在するが、宿主免疫応答が弱いために呼吸困難、間質性肺炎増悪は緩徐進行性である。しかし、インフリキシマブ投与中に発現したニューモシスチス肺炎は、AIDS の場合と異なり急速進行例が多い。

3. ニューモシスチス肺炎の早期診断 (PCR 診断)

Ward ら⁹⁾は、ニューモシスチス肺炎を診断し得た症例の背景因子を多施設間で解析し、0.01%未満の有意差を認めた因子は、過去にニューモシスチス肺炎を診断したことの有無、AIDS を日常診療しているか否かなどの要因が含まれていた。換言すればニューモシスチス肺炎を疑えるかにより診断率が異なる。

当科では、①乾性咳嗽、労作時息切れ、発熱などの進行性の臨床症候、②進行性低酸素血症、③胸部 X 線・胸部 CT で間質性肺炎を認めた際に、誘発喀痰から PCR 法で *P. jirovecii* の DNA 診断を施行し、ニューモシスチス肺炎の確定診断をおこなっている。本法は、きわめて高感度で、約 8 時間で迅速診断できる。生理食塩水または 2%食塩水 10 ml を超音波ネブライザーで吸入後、喀

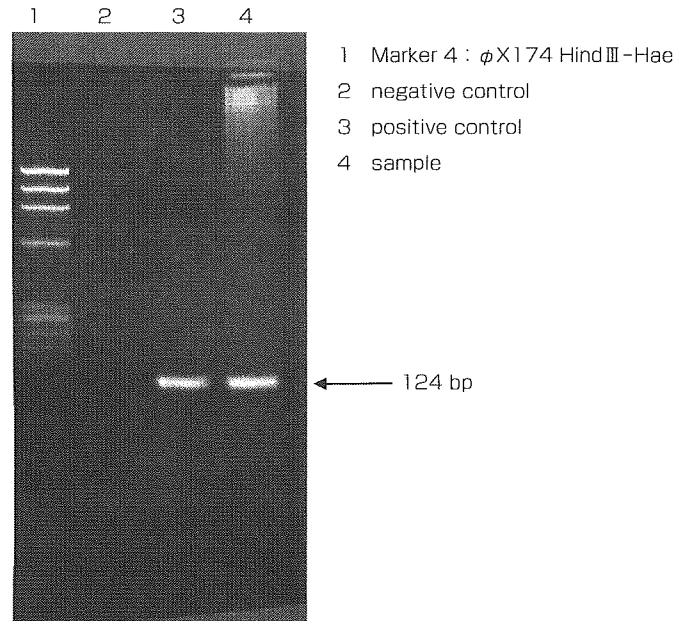
出喀痰 (誘発喀痰) を検体として用いる。喀痰サンプルに dithiothreitol (DTT) を添加して 37°C 10 分間反応して粘性を低下させた後、PBS で 2 回洗浄し、プロテアーゼ K を加えて 60°C で 6 時間、蛋白分解してフェノール/クロロホルム抽出にて除蛋白する。DNA をエタノール沈殿し、TE 溶解後、100 pM のプライマー 1: 5'-AGTTACGGCCATACCTCAGA-3', プライマー 2: 5'-AAAGCTACAGCACGTCGTAT-3' とともに PCR をおこなう。95°C 1 分-55°C 1 分-72°C 1.5 分 35 サイクルにより増幅されたサンプルの一部を 3%アガロースゲルで電気泳動し、124 bp の特異的バンドとして検出する^{10)~14)} (図 1)。

PCR による DNA 診断では、存在する DNA を高度に増幅するために、偽陽性が問題となる。しかし、DNA 診断で陽性と診断した症例では全例が、ST 合剤による治療開始 2 週間後にはニューモシスチス DNA は検出されなくなり、偽陽性である症例はないことを確認している¹²⁾。PCR 法の有用性は高く評価されており、PCR 法が陽性、BALF での細胞診が陰性の症例でも、治療開始が推奨される¹⁵⁾。

4. ニューモシスチス肺炎の治療と予防

1) ニューモシスチス肺炎の治療の実際

ニューモシスチス肺炎の標準的治療法を表 2 に示す。基本的には 80~90%以上の例でトリメトプリム/スルファメトキサゾール (TMP/SMX; ST 合剤) が奏効する。ニューモシスチス肺炎の治療後には局所で過剰な炎症反応が生じるために、治療後 3~4 日はかえって低酸素血症が増悪する。この過剰反応を抑制する目的で、一般的に中等症以上のニューモシスチス肺炎の治療では、ST 合剤の投与と同時にステロイドを 2~4 週間併用する。一般に ST 合剤やペンタミジンが無効であることは少なく、治療経過中の増悪に関しては、サイトメガロウイルスを含む他の感染症の併発や薬剤に対するアレルギーなどを考えるべきである。加えて、肺胞-毛細血管の膜透過性が亢進して肺浮腫や成人呼吸窮迫症候群の病態に進展することもあり、輸液量を慎重に管理する必要がある。とくに、ST 合剤を静脈注射する場合、溶解にかなりの容



図① 誘発喀痰を用いた *Pneumocystis* の DNA 診断

表② ニューモシスチス肺炎の治療法

トリメトプリム/スルファメトキサゾール (TMP/SMX ; ST 合剤)	
トリメトプリム成分で 15~20 mg/kg/日を 6~8 時間に分割して経口	
14 日間 (体重 50 kg であれば ST 合剤 (バクタ) 9~12 錠/日)	
経口投与できない場合, 効果が期待できない場合静注	
〔体重 50 kg であれば ST 合剤 (バクタミン) 3~4 アンプル×3 回/日〕	
ペンタミジン	
ST 合剤がアレルギーなどで使用できないとき	
3~4 mg/kg/日を 1 回/日で 14 日間点滴静注	
予防には 300 mg を注射用蒸留水に溶解して吸入	
プレドニゾン	
発症早期に中等度以上の重症例に上記治療と併用	
80 mg 5 日間 → 40 mg 5 日間 → 20 mg	

量の輸液が必要であり, 輸液量過剰には注意を要する。治療に対する反応が明らかになるまでの平均期間は 4~6 日であり, 治療反応性は発熱, 呼吸回数, PaO₂, CRP, β -D-グルカン値を確認しつつ, 非 AIDS 患者での発症では 2 週間, AIDS 患者での発症例では 3 週間服薬するのが標準的治療である。

2) ニューモシスチス肺炎の一次予防とその問題点

当科では, 誘発喀痰を検体としたニューモシスチス肺炎の非侵襲的 DNA 診断を試み, 検出率, 特異性, 迅速性における有用性を検討するとともに, これによりニュー

モシスチス肺炎を早期診断し得たりウマチ性疾患約 30 例の解析より, 発症リスクを抽出し, 当該症例への ST 合剤あるいはペンタミジンによる一次予防を施行した¹³⁾¹⁴⁾。一次予防指標として, ① PSL 換算 ≥ 1 mg/kg 使用, ② PSL 換算 ≥ 0.5 mg/kg かつ免疫抑制薬併用, ③ リンパ球 $\leq 400/\text{mm}^3$, ④ IgG ≤ 700 mg/dl のうち, ①または②, かつ, ③または④を満たす症例と定め, 本基準に該当するリウマチ性疾患症例に対して ST 合剤 1 g 連日あるいは 2 g 隔日投与などの一次予防を施行した。その結果, ニューモシスチス肺炎の発症は皆無となった。しかし, RA ではステロイド薬は少量で, また生物学的製剤

に関する項目がないため、本基準には多くの症例が該当せず、 β -D-グルカン高値、高齢者、既存肺疾患、血球減少、糖尿病合併などをも盛り込んだ他のリウマチ疾患と分別化したRA独自の一次予防基準設定が必要であり、全国的な症例の収集・解析を要する。なお、以前から葉酸代謝阻害作用をもつMTXとST合剤との併用は禁忌とされる傾向にあったが、そのようなエビデンスはなく、現在では血球減少、肝障害などのモニタリングを怠らない限り併用には支障ないとされる¹⁵⁾。

3) ニューモシスチス肺炎の今後の課題

今回の市販後調査の結果から、わが国ではインフリキシマブによるニューモシスチス肺炎対策としてまず、早期診断のためのニューモシスチス肺炎に関する知識の普及、HRCTやPCR診断による早期診断法、さらに一次予防基準の策定が急務であると考えられる。結核に関しては、欧米ですでにイソニアジドの投与により発症を抑制しうることが判明しており、わが国の市販後調査においても適切な一次予防を施した患者からの結核の発症は認めず、一次予防がきわめて有効であった好例となっている。一方、最も有効なニューモシスチス肺炎の一次予防薬であるST合剤の市販後調査における副作用は約10%と報告される。しかし、われわれの検討では、リウマチ性疾患においては一般の約2~3倍の頻度で皮疹、発熱、肝障害、頭痛、腎障害、血球異常などの有害事象が確認されている。したがって、実際にはST合剤を服用できない症例が多くなることが想定され、第二選択薬となるペンタミジン吸入を施行することになるが、ペンタミジンの吸入による予防は絶対的なものではなく、肺尖部のニューモシスチス肺炎や肺外でのニューモシスチス発症が報告される。

おわりに

インフリキシマブ投与後のニューモシスチス肺炎の発症は、欧米にくらべ明らかに高頻度であり、現在解析中である。ステロイド薬は最大の発症危険因子であり⁴⁾、欧米にくらべ体格の割にはステロイド薬の投与量が多い現状が問題かもしれない。したがって、インフリキシマ

ブの使用によってRAの疾患活動性の制御が得られ、DAS 28<2.6などの寛解基準を満たせば、まず、ステロイド薬の減量をすべきである。可溶性TNFレセプター拮抗薬であるエタネルセプトが市販され、抗IL-6レセプター抗体トシリズマブ、完全ヒトTNF- α 抗体アダリムマブなどの生物学的製剤の導入が予定されるが、いずれにおいても同様の注意が必要で、ニューモシスチス肺炎を含めた併発症に対処できない医師は、これらの生物学的製剤の使用は控えるべきであろう。一方、一次予防として使用されるST合剤はHIV感染症患者では予防基準が確立し、有効性も確認されているが、リウマチ性疾患ではST合剤の有害事象発生率は有意に高く、インフリキシマブ投与全患者に予防投与するのは賢明ではない。ニューモシスチス肺炎発症の危険因子を解析したうえで、早期診断法の普及と一次予防ガイドラインの制定は、最重要課題の1つである。



文献

- 1) Edman JC, Kovacs JA, Masur H *et al* : Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi. *Nature* **334** : 519-522, 1988
- 2) Obayashi T, Yoshida M, Mori T *et al* : Plasma (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan determination in the diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. *Lancet* **345** : 17-20, 1995
- 3) Yasuoka A, Tachikawa N, Shimada K *et al* : (1 \rightarrow 3) β -D-glucan as a quantitative serological marker for *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Clin Diagn Lab Immunol* **3** : 197-199, 1996
- 4) Roblot F : Management of *Pneumocystis pneumonia* in patients with inflammatory disorders. *Expert Rev Anti Infect Ther* **3** : 435-444, 2005
- 5) Sowden E, Carmichael AJ : Autoimmune inflammatory disorders, systemic corticosteroids and *pneumocystis pneumonia* : a strategy for prevention. *BMC Infect Dis* **4** : 42, 2004
- 6) Shelhamer JH, Gill VJ, Quinn TC *et al* : The laboratory evaluation of opportunistic pulmonary infections. *Ann Intern Med* **124** : 585-599, 1996
- 7) Chen W, Havell EA, Harmsen AG : Importance of endogenous tumor necrosis factor alpha and gamma interferon in host resistance against *Pneumocystis carinii* infection. *Infect Immun* **60** : 1279-1284, 1992
- 8) Hoffman OA, Standing JE, Limper AH : *Pneumocystis*