

図3 SDS-PAGEによる精製ヒストンの分析
ラット肝より精製したヒストンを18%SDS-PAGEで分画した。(文献13)より引用)

2. 抗ヒストン抗体の対応抗原エピトープ

Fritzler と Tan は、三段階蛍光抗体法を用い、抗ヒストン抗体が SLE では 20 例中 7 例 (35%) に陽性であるのに対し、DLE では 23 例中 22 例 (96%) と高頻度であることを報告した¹⁷⁾。Rubin らは RIA を用い SLE における抗ヒストン抗体の対応抗原は H2A-H2B 複合体であるとし¹⁸⁾、Portanova らはプロカインアミド誘発性ループスでは SLE と同様に H2A-H2B 複合体と強く反応するが、ヒドララジン誘発性ループスでは H2A-H2B とともに H3-H4 複合体とも弱く反応することを示した¹⁹⁾。いずれの DLE でも IgG より IgM 抗体価が高かった。その後、Totoritis らは ELISA で、症候性プロカインアミド誘発性ループスでは IgG 型抗 H2A-H2B 抗体を産生されるが、キニジンやヒドララジンによる DLE では同抗体は陰性となることを示した²⁰⁾。

各亜分画に対する抗ヒストン抗体の反応性は免疫プロット法では RIA や ELISA の成績と異なる。Hardin らは免疫プロット法で SLE 血清 24 例中 11



図4 免疫プロット法による抗ヒストン抗体の検出
精製ヒストンを抗原とし、免疫プロット法で SLE 患者血清中の抗ヒストン抗体を検出した。レーン1では全ての亜分画と、レーン2では H1d/e, H1c, H10, H3, H2B と、レーン3-5では H1d/e, H1c, H10, H2B と、レーン6では H1d/e, H1c, H10 と、レーン7では H1d/e, H1c, と、レーン8では H1d/e, H2B と、レーン9では H1d/e と反応した。レーン10-18 では反応はみられなかった。レーン19の DLE 患者血清は、H1d/e, H1c, H10, H2B と反応した。(文献13)より引用)

例 (46%) に抗ヒストン抗体を見出し、H1 と H2B に主要エピトープが存在するとした²¹⁾。さらに、エピトープは H1 の C 末端側、および H2B の N 末端側に存在し、ヌクレオソーム外部の露出部位にあることを示した。著者らの検討でも、各亜分画特異抗体陽性率は、抗 H1d/e, 抗 H1c, 抗 H10, 抗 H2B, 抗 H3, 抗 H4, 抗 H2A 抗体の順に高く、特にいずれかの H1 蛋白を認識する患者全血清が H1d/e と反応しており、H1d/e にユニバーサルエピトープが存在することが示された (図4, 図5)¹³⁾。

Craft らは免疫プロット法で DLE における各亜分画に対する抗ヒストン抗体の反応性を検討した²²⁾。プロカインアミド誘発性ループスと SLE はともに H1 および H2B と、一部は H3 とも反応したが、H2A および H4 との反応はまれであった。一方、ヒドララジン誘発性ループスでは各亜分画と広く反応し、H3, H2A, H4 との反応も多くみられた。興味深いことに、ヒドララジン誘発性ループスの抗ヒストン抗体はヒストン分子中央の球状部位 (トリプシン抵抗性の疎水性部位) を認識するのに対し、SLE およびプロカインアミド誘発性ループスではヒストンの N 末端か C 末端近傍 (トリプシン感受性の親水性部位) を認識し、両者のエピトープが異なることが示された。免疫プロット法を用いた Portanova らの報告は Craft らの成績を一部支持

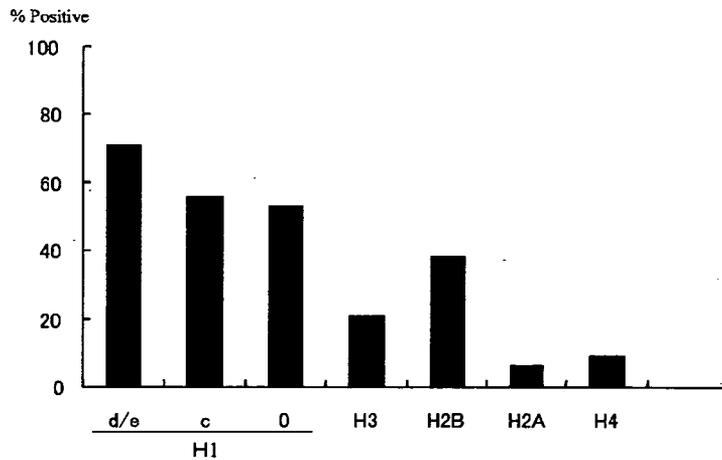


図5 SLE 患者血清中の各ヒストン亜分画特異抗体の陽性率

SLE 患者血清を用い、免疫プロット法でヒストンの各亜分画に対する抗体を検討した。34 例中 24 例 (71%) にいずれかのヒストン亜分画に対する自己抗体が認められ、各亜分画特異抗体の陽性率は、抗 H1d/e, 抗 H1c, 抗 H1⁰, 抗 H2B, 抗 H3, 抗 H4, 抗 2A 抗体の順に高かった。(文献 13)より引用)

表1 SLE と DLE における抗ヒストン抗体の対応抗原エピトープ

報告者 (年)	測定法	DLE		
		SLE	プロカインアミド	ヒドララジン
Rubin ら (1982)	RIA	H2A-H2B	H2A-H2B	H2A-H2B, H3-H4
Hardin ら (1983)	IB	H1 (C 末端), H2B (N 末端)		
Craft ら (1987)	IB	H1, H2B, H3 (親水性部位)	H1, H2B, H3 (親水性部位)	全ヒストン (疎水性部位)
Portanova ら (1987)	IB	全ヒストン (親水性部位)	H2A-H2B (疎水性部位)	H3, H4 (疎水性部位)
Suwa ら (2004)	IB	H1 (d/e, c, 0), H2B		

IB: 免疫プロット (文献 6)より引用)

するが、プロカインアミド誘発性ループスでは H2A-H2B 複合体のトリプシン抵抗性部位に対する抗体が一般的としている²³⁾。

Hardin および Craft らの成績は、SLE およびプロカインアミド誘発性ループスでは抗ヒストン抗体はヌクレオソームの露出部位と反応することから、正常なヌクレオソーム構造が抗原となり、またヒドララジン誘発 DLE では変性したクロマチンが自己抗体産生に関与する可能性を示しており、両者の発症機序の違いが示唆される。しかし、抗ヒストン抗体の対応抗原エピトープの報告は一定せず (表 1)、DLE の診断や抗体検出法の統一など検討を要する。

3. 抗ヒストン抗体の臨床的意義

抗ヒストン抗体は SLE の 50-70% と抗 dsDNA 抗体と同様に高頻度に検出される自己抗体であり、活動期には 80% 以上が陽性を示す²⁴⁾。薬剤の副作用によって SLE に類似の病態を引き起こす DLE では、発熱、筋痛、関節痛がしばしばみられ、蝶型紅斑、ディスクイド疹、脱毛、口腔内潰瘍なども認め

るが、腎炎や中枢神経病変など重篤な病変はまれである⁹⁾。抗不整脈薬であるプロカインアミドと降圧薬であるヒドララジンが DLE の原因薬剤として頻度が高い⁹⁾。DLE では SLE に特徴的な抗 dsDNA や抗 U1RNP, 抗 Sm 抗体などの非ヒストン蛋白に対する抗体が検出されず、抗ヒストン抗体の測定が診断上有用である。興味深いことに、DLE ではヒストンおよび変性 DNA に対する自己抗体が高率に産生されるのに対して、非ヒストン抗体やネイティブ DNA に対する自己抗体はみられない⁹⁾。

抗ヒストン抗体は SLE と DLE 以外の膠原病でも広く検出される。関節リウマチ (RA) では抗ヒストン抗体の頻度は 5-15% と低いが、Felty 症候群や血管炎合併 RA では各 83% と 75% と高頻度である^{25,26)}。若年性関節リウマチ (JRA) では抗核抗体陽性例、ブドウ膜炎合併例で陽性率が高い²⁷⁾。Sato らは、限局性および全身性強皮症で抗ヒストン抗体の頻度が高いことを報告した^{28,29)}。Wallace らは、CREST 症候群と混合性結合組織病 (MCTD) を含む強皮症関連疾患において、抗 (H2A-H2B)-DNA

抗体が26例中10例(38%)と高率に検出されることを示した³⁰⁾。非リウマチ性疾患においても、原発性胆汁性肝硬変で抗H1抗体が、肺小細胞癌合併重急性知覚神経症で抗H1⁰抗体が検出されるとの報告がある^{31~33)}。

4. 抗ヒストン抗体の産生機序と病因的意義

自然発症SLEモデルマウスにおいて抗ヒストン抗体が産生される^{5,12)}。これらの抗体の出現時期、抗体価、特異性は、マウスの遺伝的背景によって異なり、こうした抗体の分析により、抗ヒストン抗体の産生機序と病因的意義解明に関わる情報がもたらされると期待されている。

(NZBxNZW)F1マウスにおいては、主としてH2BとH3に対する抗ヒストン抗体が産生される¹⁶⁾。抗体価は、4-8月齢に上昇し、この時にIgMからIgGへのクラススイッチが起こる。Portanovaらは、合成ペプチドを用いたエピトープ解析から、(NZBxNZW)F1マウスのおよそ半数が抗H2B抗体陽性となり、これらの80%以上がN末端のエピトープを認識することを明らかとした³⁴⁾。このN末端のエピトープは、MRL-MP/Fas^{lpr}マウスおよびSLE患者血清中の抗ヒストン抗体により認識されることから、ユニバーサルエピトープであることが示唆される^{35~37)}。

MRL-MP/Fas^{lpr}マウスにおいては、コアヒストンに加えてリンカーヒストンH1に対する自己抗体

が産生される³⁸⁾。抗H1抗体のエピトープおよび出現様式は、Igクラスによって大きく異なる。すなわち、IgG型抗H1抗体のエピトープは、H1分子の球状部とC末端部の両者を含むGC-H1断片にあるのに対して、IgM型抗H1抗体のエピトープはC末端部にある³⁸⁾。IgG抗体価は、週齢とともに上昇するのに対してIgM抗体のそれは変動しない。さらに、同マウス血清中には、H1バリエントH1⁰に対する抗体が産生される³⁸⁾。著者らの免疫プロット法を用いた経時的検討でも、マウス血清は、週齢とともに各亜分画に対する抗体を産生することが確認された。(図6)¹³⁾。こうした成績は、H1に対する自己抗体産生が他の自己免疫応答のトリガーとなる可能性を示唆する¹³⁾。

(SWRxNZB)F1(SNF1)マウスでは、H2Bのアミノ酸10-33番目、H4のアミノ酸16-39番目および71-94番目、H3のアミノ酸85-102番目に主要な自己反応性T細胞エピトープが示されている^{5,39)}。さらに、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)クラスII抗原から溶出したペプチドの構造解析から、H1⁰のアミノ酸22-42番目(STDHPKYSDMIVAAIQAEKNR)に自己免疫応答を刺激するT細胞エピトープ(H1⁰₂₂₋₄₂エピトープ)が同定された⁴⁰⁾。このH1⁰₂₂₋₄₂エピトープは同時にB細胞エピトープであり、このエピトープを認識する抗体が抗dsDNA抗体と交差反応を示すこと、H1⁰₂₂₋₄₂をSNF1マウスに免疫すると腎炎が悪

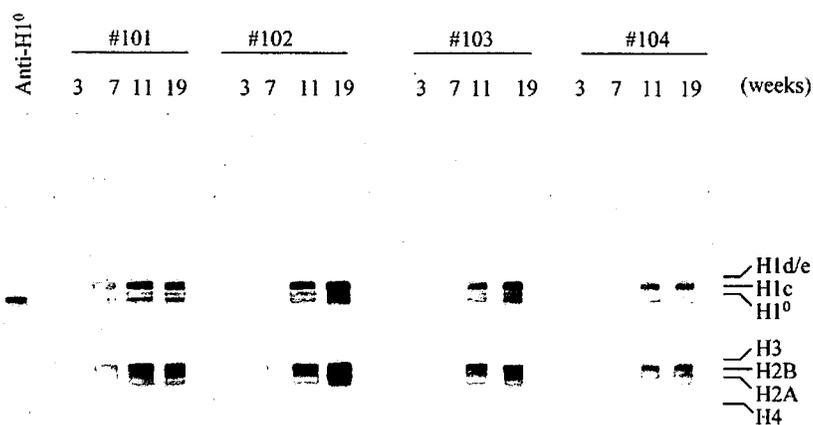


図6 免疫プロットによるMRL-MP/Fas^{lpr}マウス血清中のヒストン各亜分画に対する反応性の経時的検討

MRL-MP/Fas^{lpr}マウス血清を用いてヒストン各亜分画に対する抗体を免疫プロット法により検出した。マウス血清は、加齢とともに各亜分画に対する抗体を産生した。H1d/eに対する抗体が最初に出現し、ついでH1c、H1⁰、H3、H2Bに対する抗体が出現した。H2A、H4に対する抗体は一部のマウス血清でのみ認められた。(文献13)より引用)

化することなどより、病因・病態形成上重要であることが示唆されている⁴⁰⁾。著者らは、合成ペプチドを用いた ELISA で、MRL-MP/Fas^{lpr} マウスにおける H1⁰₂₂₋₄₂ エピトープの意義を検討した。3週ではマウス血清中の IgG 抗ヒストン H1⁰ 抗体はいずれも陰性であったが、20匹中16匹(80%)では週齢とともに抗体価の上昇を認め、同抗体の高率な存在が示された¹³⁾。H1⁰ は分裂細胞では発現せず、肝細胞や神経細胞など静止期の細胞にのみ認められる⁴¹⁾。H1⁰ を高発現している静止期の細胞がアポトーシスをおこし、細胞死によって抗原提示されている可能性が示唆される。

ヒトおよびマウスにおいて、抗ヒストン抗体産生と抗 dsDNA 抗体産生には密接な連関がみられることが指摘されているが、これは両抗体の産生が共通の免疫学的機序による可能性を示唆する^{5,12)}。Amoura らは、MRL-MP/Fas^{lpr} マウス血清中には、抗ヒストン抗体および抗 dsDNA 抗体産生に先行して、ヌクレオソームそのものを認識する抗体が見出されることを示し、ヌクレオソームに対する免疫応答がその構成成分である DNA とヒストンに対する自己抗体産生を惹起する可能性を提唱している^{6,42)}。

おわりに

近年ヒストンの構造と機能の解析が進み、エピジェネティクスがヒストン蛋白の翻訳後修飾によるクロマチンの構造変化によって制御されていることが明らかにされた。ヒストンを標的とする自己抗体産生機序の追求は、SLE の病因、病態を解明する上で、重要と考えられる。

文 献

- 1) Tan, E. M. : Antinuclear antibodies : Diagnostic markers for autoimmune disease and probes for cell biology. *Adv. Immunol.* **44** : 93-151, 1989.
- 2) 三森経世 : 抗核抗体研究の進歩—自己抗体が認識する核および細胞質蛋白の構造と機能—。リウマチ **32** : 366-378, 1992.
- 3) 諏訪 昭 : 自己抗体陽性。診断と治療 **92** : 241-246, 2004.
- 4) Hardin, J. A. : The lupus autoantigens and the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Arth. Rheum.* **29** : 457-460, 1986.
- 5) Monestier, M., Kotzin, B. L. : Antibodies to histones in systemic lupus erythematosus and drug induced lupus syndromes. *Rheum. Dis. Clin. Nor. Am.* **18** : 415-436, 1992.
- 6) 諏訪 昭 : 抗ヒストン抗体。日本臨床 (増刊号 : 広範囲血液・尿化学検査 免疫学的検査) (印刷中)。
- 7) Amoura, Z., et al. : The key role of nucleosomes in lupus. *Arth. Rheum.* **42** : 833-843, 1999.
- 8) Ito, T : Nucleosome assembly and remodeling. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **274** : 1-22, 2003.
- 9) McGhee, J. D., Felsenfeld G. : Nucleosome structure. *Annu. Rev. Biochem.* **49** : 1115-1156, 1980.
- 10) Khochbin S. : Histone H1 diversity ; bridging regulatory signals to linker histone function. *Gene* **271** : 1-12, 2001.
- 11) Von Holt, C., et al. : Isolation and characterization of histones. *Methods Enzymol.* **70** : 431-523, 1989.
- 12) Stemmer. C., Muller. S. : Histone autoantibodies other than (H2A-H2B)-DNA autoantibodies. Peter. J. B., Shoenfeld., Y. eds. *Autoantibodies*, Elsevier Science B. V., Amsterdam. pp. 373-384, 1996.
- 13) Suwa, A., et al. : Evolution of autoantibodies to histones and a specific histone epitope in MRL-MP/Fas^{lpr} mice and Japanese patients with lupus. *Arth. Rheum.* **48** : S228, 2004.
- 14) Tan, E. M., et al. : Studies on antibodies to histones by immunofluorescence. *Scand. J. Immunol.* **5** : 811-818, 1976.
- 15) Rubin, R. L., et al. : A solid-phase radioimmunoassay for antihistone antibodies in human sera : comparison with an immunofluorescence assay. *Scand. J. Immunol.* **15** : 63-70, 1982.
- 16) Gioud, M., et al. : In vivo and in vitro production of anti-histone antibodies in NZB/NZW mice. *J. Immunol.* **131** : 269-274, 1983.
- 17) Fritzler, M. J., Tan, E. M. : Antibodies to histone in drug-induced and idiopathic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* **62** : 560-567, 1978.
- 18) Rubin, R. L., et al. : Specificity of anti-histone antibodies in systemic lupus erythematosus. *Arth. Rheum.* **25** : 779-782, 1982.
- 19) Portanova, J. P., et al. : Reactivity of anti-histone antibodies induced by procainamide and hydralazine. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **25** : 67-79, 1982.

- 20) Totoritis, M. C., et al. : Association of antibody to histone complex H2A-H2B with symptomatic procainamide-induced lupus. *N. Engl. J. Med.* **318** : 1431-1436, 1988.
- 21) Hardin, J. A., Thomas, J. O. : Antibodies to histones in systemic lupus erythematosus : Localization of prominent autoantigen on histone H1 and H2B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80** : 7410-7414, 1983.
- 22) Craft, J. E., et al. : Autoantigenic histone epitopes : A comparison between procainamide- and hydralazine-induced lupus. *Arth. Rheum.* **30** : 689-694, 1987.
- 23) Portanova, J. P., et al. : Anti-histone antibodies in idiopathic and drug-induced lupus recognize distinct intra-histone regions. *J. Immunol.* **138** : 446-451, 1987.
- 24) Gioud, M., et al. : Histone antibodies in systemic lupus erythematosus. *Arth. Rheum.* **25** : 407-413, 1982.
- 25) Cohen, M. G., Webb J. : Antihistone antibodies in rheumatoid arthritis and Felty's Syndrome. *Arth. Rheum.* **32** : 1319, 1989.
- 26) Bernstein, R. M., et al. : Patterns of anti-histone antibody specificity in systemic rheumatic disease. *Arth. Rheum.* **28** : 285-293, 1985.
- 27) Ostensen, M., et al. : Identification of anti-histone antibodies in subsets of juvenile chronic arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **48** : 114-117, 1989.
- 28) Sato, S., et al. : Antihistone antibodies in patients with localized scleroderma. *Arth. Rheum.* **36** : 1137-1141, 1993.
- 29) Sato, S., et al. : Antihistone antibodies in systemic sclerosis : association with pulmonary fibrosis. *Arth. Rheum.* **37** : 391-394, 1994.
- 30) Wallace, D. J., et al. : Antibodies to histone (H2A-H2B)-DNA complexes in the absence of antibodies to double-stranded DNA or to (H2A-H2B) complexes are more sensitive and specific for scleroderma-related disorders than for lupus. *Arth. Rheum.* **37** : 1795-1797, 1994.
- 31) Penner, E., et al. : High prevalence of antibodies to histones among patients with primary biliary cirrhosis. *Clin. Exp. Immunol.* **70** : 47-52, 1987.
- 32) Monestier, M., et al. : Anti-histone antibodies in subacute sensory neuropathy. *J. Neurooncol.* **11** : 71-75, 1989.
- 33) Vila, J. L., et al. : Autoantibodies against the H1^o subtype of H1. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **45** : 499-503, 1987.
- 34) Portanova, J. P., et al. : Histone autoantigens in murine lupus. Definition of a major epitope within an accessible region of chromatin. *J. Immunol.* **144** : 4633-4640, 1990.
- 35) Muller, S., et al. : Antigenic structure of histone H2B. *Biochem. Biophys. Acta.* **827** : 235-246, 1985.
- 36) Muller, S., et al. : Reactivity of autoantibodies in systemic lupus erythematosus with synthetic core histone peptides. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **89** : 288-296, 1989.
- 37) Rekvig, et al. : Human antinuclear autoantibodies crossreacting with plasma membrane and the N-terminal region of histone H2B. *Immunol. Invest.* **16** : 535-547, 1987.
- 38) Monestier, N., et al. : Specificities of IgM and IgG anti-histone H1 autoantibodies in autoimmune mice. *Clin. Exp. Immunol.* **81** : 39-44, 1990.
- 39) Lu, L., et al. : Major peptide autoepitope for nucleosome-specific T cells of human lupus. *J. Clin. Invest.* **104** : 345-355, 1999.
- 40) Kaliyaperumal, A., et al. : Naturally processed chromatin peptides reveal a major autoepitope that primes pathogenic T and B cells of lupus. *J. Immunol.* **168** : 2530-2537, 2002.
- 41) Smith B. J., Johns. E. W. : Isolation and characterization of subfractions of nuclear protein H10. *FEBS Lett.* **110** : 25-29, 1980.
- 42) Amoura, Z., et al. : Nucleosome-restricted antibodies are detected before anti-dsDNA and/or antihistone antibodies in serum of MRLMp lpr/lpr and +/+ mice, and are present in kidney eluates of lupus mice with proteinuria. *Arth. Rheum.* **37** : 1684-1688, 1994.

VIII 免疫学的検査 G. 自己抗体

抗 Ku 抗体

Anti-Ku antibodies

諏訪 昭

Key words: autoantibodies, overlap syndrome, systemic sclerosis, polymyositis, DNA-dependent protein kinase

1. 概 説

抗 Ku 抗体は Mimori らが 1981 年に我が国において強皮症 (systemic sclerosis: SSc)-多発性筋炎 (polymyositis: PM) 重複症候群 (OL) 患者に初めて見だし、報告した自己抗体 (抗核抗体) である¹⁾。その後、米国において抗 Ku 抗体と同一である抗 p70/p80 抗体²⁾、抗 p66/p86 抗体、および抗 86-70 kDa 抗体が報告された。抗 Ku 抗体の対応抗原である Ku 抗原は、70 kDa と 80 kDa 蛋白ヘテロ 2 量体より構成される。Ku 蛋白は、二本鎖 DNA 末端に特異的に結合し^{3,4)}、DNA 上をエネルギー非依存的に移動する性質より、当初は DNA の修復や転位に関与すると考えられていた⁴⁾。その後、様々な遺伝子調節領域に結合する蛋白が Ku 蛋白と相同であるとの報告が相次ぎ、Ku 抗原の転写調節因子としての可能性が提唱された。1992 年以降、Ku 蛋白が二本鎖 DNA の存在下に様々な核蛋白をリン酸化するセリン・スレオニンキナーゼである DNA 依存性プロテインキナーゼ (DNA-PK) の調節因子であることが報告され、DNA-PK と Ku 蛋白の機能の解明が急速に進んだ^{5,6)}。DNA-PK は触媒サブユニットである 460 kDa の巨大蛋白 (DNA-PKcs) と Ku 蛋白が複合体を構成し、種々の転写因子や酵素をリン酸化して活性化すると考えられる⁵⁻⁷⁾。更に、DNA-PKcs は放射線高感受性と免疫不全を示す SCID マウスの原因遺伝子であること、DNA-PKcs の C 末端には毛細血管拡張性運動失調症 (ataxia telangiectasia: AT) の原因遺伝子である ATM と相同の構造をもつことなどが、明らかにされた^{8,9)}。Ku 蛋白は

DNA-PK の活性調節を通じ、多機能性転写調節因子として遺伝子発現の調節、DNA の修復、V(D)J 組換え、複製、成長制御などに重要な役割を果たす可能性が示唆されている。

2. 検査の目的

抗 Ku 抗体の出現頻度は低いものの、日本人では OL、特に SSc-PM 重複例に特異性が高い。したがって、本抗体は OL の補助診断、SSc または PM 例の病型分類に有用な疾患標識抗体といえる。

3. 試料の採取方法、保存条件

血清中の IgG は安定であり、採血後、血清を分離し、窒化ナトリウムを 0.01% 加えて凍結保存すれば数年以上使用できる。凍結融解によっても抗体価はほとんど変化しない。

4. 測定法

a. 間接蛍光抗体法

Ku 抗原は種属特異性のため、間接蛍光抗体法では、抗 Ku 抗体は核材によっては検出されないことがある¹⁾。これは Ku 抗原エピトープが種の進化を通じて変異の度合いの大きい部位に相当するためと考えられる。HEp-2 細胞などのヒト培養細胞では抗 Ku 抗体によって核全体が微細斑紋状に染色され、核小体は染色されない。一方、ラット肝を核材に用いると陰性となる。したがって、ヒト培養細胞とラット肝を用いた蛍光抗体法で結果に解離がある場合には、抗 Ku 抗体の存在を疑う。

Akira Suwa: Department of Internal Medicine, Keio University School of Medicine 慶應義塾大学医学部 内科

0047-1852/05/¥40/頁/JCLS

b. 二重免疫拡散法

抗 Ku 抗体は沈降抗体であるため、アガロースゲル内二重免疫拡散法により、標準血清との沈降線の一致によって検出する。アガロースゲルはアガロース 0.6g をリン酸緩衝食液 (PBS) 1l に加えて加熱溶解し、プラスチックシャーレ (径 9cm) に分注して固めた 0.6% アガロースにゲルパンチャーで孔を開け (径 7mm, 3-4mm 間隔), アガロースを吸引後, 孔に抗原液, 周囲に標準血清および被検血清を 100 μ l ずつ注入し, 室温で 24 時間 (~48 時間) 静置後に判定する。抗原として家兎胸腺や仔ウシ胸腺のリン酸緩衝食液抽出物を用いた際には, 種特異性のため沈降線が薄い。蛋白濃度を上げるか, ヒト抗原を用いると沈降線が明瞭となる。抗原液には蛋白分解酵素阻害剤を加える。

c. 免疫ブロット法

HeLa 細胞抽出物または精製 Ku 蛋白を 10% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で分画後, ニトロセルロースフィルターに転写する。このフィルターを被検血清, 次に二次抗体 (アルカリホスファターゼまたはペルオキシダーゼ結合抗ヒト IgG) と反応させ, 発色反応により抗体を検出する。抗 Ku 抗体は, 70kDa 蛋白と 80kDa 蛋白の両者もしくは一方と反応するが, 日本人患者では全例が 70kDa 蛋白と反応することが示されている。

d. 免疫沈降法

³⁵S メチオニンで標識した HeLa 細胞とプロテイン A セファロースに結合させた被検血清中の IgG と細胞抽出物を反応させ, 免疫沈降物を得る。沈降物を 10% SDS-PAGE で分画後, オートラジオグラフィーで検出する。抗 Ku 抗体は, 70kDa 蛋白と 80kDa 蛋白を沈降する。

e. ELISA

著者らは, リコンビナント Ku 抗原を用いた ELISA で両 Ku 蛋白に対する自己抗体測定法を開発した。70kDa 蛋白および 80kDa 蛋白をコードする cDNA の大腸菌発現産物を精製し, マイクロタイタープレートに固相化し, 血清, 次に二次抗体と反応させ, 最後に基質を加え, 吸光度を測定する。ELISA は感度が高く, 多数

表 1 抗 Ku 抗体陽性例の臨床的特徴

臨床症状・検査所見	陽性頻度 (%)
レイノー現象	100
強皮症様皮膚硬化	92
筋炎	92
肺線維症	50
食道運動機能低下	42
多発関節炎	33
発熱 ($\geq 38^{\circ}\text{C}$)	25
漿膜炎	17
手指潰瘍・陥凹性癬痕	17
ヘリオトロープ疹	8

検体を処理できる利点があるが, 非特異的反応がみられることがある。

5. 基準値

健常人では陰性。

6. 臨床的意義

教室における抗 Ku 抗体の疾患別出現頻度の免疫拡散法での検討では, 2 つ以上の膠原病が 1 人の患者に重複してみられる OL における抗 Ku 抗体の陽性率が 27% と最も高く, SLE および SSc では各々 0.6% および 2% と低頻度であった。OL の中では, SLE-SSc-PM および SSc-PM 重複例に 50% と最も高頻度に検出された。更に SSc と PM の診断基準を同時に満たさない症例でもレイノー現象, 手指硬化症, 筋原性酵素上昇などの強皮症様症状と筋症状を認めた。表 1 に抗 Ku 抗体陽性 12 例の臨床症状を示す。レイノー現象, 強皮症様皮膚硬化, 筋炎症状が 90% 以上と高頻度で, 関節炎や 38°C 以上の発熱などの筋外症状は比較的少ない。また皮膚硬化範囲は四肢に限局し, 筋炎は中等量以上のステロイド剤によく反応するなど, 比較的生存予後良好な一病型を構成する。抗 Ku 抗体価は疾患活動性とは相関せず, ステロイド治療により抗体価は低下しても, 陰性化はしない。

抗 Ku 抗体の疾患標識抗体としての意義は我が国では確立されている。一方, 欧米における抗 Ku 抗体の出現様式はこの成績と異なり,

ELISAでは、SLE 39%、MCTD 55%、SSc 40%に見いだされ、そのうち高抗体価例は各々14%、18%、13%と報告されている²⁾。また免疫沈降法と免疫プロット法でも、抗Ku抗体は各々SLEの約10%、19%に検出されている。免疫拡散法、免疫沈降法、免疫プロット法、ELISAにより米国人の膠原病患者で抗Ku抗体を検出した著者らの検討でも、SLEでの陽性率が高かった。しかしSLE患者での抗体価は低く、日本人患者では大多数が高力価であることより、高力価の抗Ku抗体がOLと関連する可能性もある。人種による抗Ku抗体出現様式の差異は、遺伝的素因や環境要因の違いを反映するものと考えられる。抗Ku抗体産生が免疫遺伝学的に

規定されていることを示す成績が日本人患者で認められており、今後、欧米人患者との比較検討が必要である。

7. 関連検査項目

著者らは、DNA-PKcsを標的とする自己抗体(抗DNA-PKcs抗体)を膠原病患者血清中に見いだしている¹⁰⁾。抗DNA-PKcs抗体陽性10例中6例では抗Ku抗体が同時に陽性で、両抗体の高率の併存が示された。こうした事実は、細胞内でKu蛋白とDNA-PKcsとが複合体を形成し、antigen drivenにより抗体産生を惹起する可能性を示唆しており、自己抗体産生機序を考えるうえで、興味深い成績である。

□ 文献

- 1) Mimori T, et al: J Clin Invest 68: 611-620, 1981.
- 2) Reeves WH: J Exp Med 161: 18-39, 1985.
- 3) Mimori T, et al: J Biol Chem 261: 2274-2278, 1986.
- 4) Mimori T, Hardin JA: J Biol Chem 261: 10375-10379, 1986.
- 5) Dvir A, et al: Proc Natl Acad Sci USA 89: 11920-11924, 1992.
- 6) Gottlieb TM, Jackson SP: Cell 72: 1-20, 1993.
- 7) Suwa A, et al: Proc Natl Acad Sci USA 91: 6904-6908, 1994.
- 8) Kirchgessner C, et al: Science 267: 1178-1183, 1995.
- 9) Hartley KO, et al: Cell 82: 849-856, 1995.
- 10) Suwa A, et al: J Clin Invest 97: 1417-1421, 1996.

VIII 免疫学的検査 G. 自己抗体

抗ヒストン抗体

Anti-histone antibodies

諏訪 昭

Key words: autoantibodies, drug-induced lupus erythematosus, histone, systemic lupus erythematosus, ELISA, immunoblotting

1. 概 説

ヒストンはクロマチンの最小基本単位であるヌクレオソームを構成する蛋白成分であり、塩基性アミノ酸(アルギニンおよびリジン)に富み、トリプトファンを含まない塩基性蛋白である。すべての有核細胞にはヒストンが存在し、そのアミノ酸配列は進化を通じて保存される。ヒストンは5種のサブユニット、H1(21kDa), H2A(14.5kDa), H2B(13.7kDa), H3(15.3kDa), H4(11.3kDa)から構成される。H2A, H2B, H3, H4は各々2分子が結合したオクタマー(コアヒストン八量体)を形成し、その周囲にDNAが2回転(146bp)巻きついてヌクレオソームとなる。リンカーヒストンH1はヌクレオソーム構造には関与せず、ヌクレオソーム間の結合とクロマチン構造保持にかかわるほかに、細胞分化との関連も指摘されている¹⁾。

抗ヒストン抗体(anti-histone antibodies: AHA)は、当初全身性エリテマトーデス(SLE)患者に発見され、その後薬剤誘発性ループス(drug-induced lupus erythematosus: DLE)患者で報告された¹⁾。AHAが高頻度に検出される薬剤は、プロカインアミドまたはヒドララジンである。また、自然発症SLEモデルマウスの解析からヌクレオソームが主要なループス抗原であり、ヌクレオソームに対する免疫応答がその構成成分であるDNAとヒストンに対する自己抗体産生のトリガーとなる可能性が示されていたが²⁾、近年、H1バリエーションであるH1⁰に対する自己免疫応答の病因的意義がSLEモデルマウスにおいて指摘されている³⁾。

2. 検査の目的

AHAはSLEに高頻度で検出される。DLEではSLEに特徴的な抗dsDNAや抗U1RNP、抗Sm抗体などの非ヒストン蛋白に対する抗体が検出されず、AHAの測定が診断上有用である。

3. 試料の採取方法、保存条件

採血後、血清を遠心分離する。IgGは安定な蛋白であり、0.02%窒化ナトリウムを加えて凍結保存する。

4. 測定法

AHA測定には、補体結合反応、蛍光抗体法、RIA、ELISA、免疫プロット(IB)法などが開発されてきた。ここでは蛍光抗体法、ELISA、IB法について記す。

なお精製ヒストンは市販されている(仔ウシ胸腺ヒストン)が、ニワトリ有核赤血球、マウス肝臓などからもHPLCにより精製できる。

a. 蛍光抗体法

AHAはHEp-2細胞を基質とする蛍光抗体法で核の均質型染色を示す。本法のみではAHAを同定できず、通常核材、塩酸処理した核材、精製ヒストンを再構成させた核材を用いた三段階の蛍光抗体法によりAHAを検出する。しかし、本法では抗H2A-H2B抗体以外のAHAは陰性となる場合があること、手技が煩雑であること、定量できないことなどより、現在は行われていない。

b. ELISA

マイクロプレートにヒストンを固相化後、非

Akira Suwa: Department of Internal Medicine, Keio University School of Medicine 慶應義塾大学医学部 内科

0047-1852/05/¥40/頁/JCLS

吸着部位をゼラチン溶液でブロックする。ウェルに希釈血清 (10^2 - 10^3 倍), 次いでアルカリホスファターゼ標識抗ヒト IgG (または IgM) を加える。最後に基質を加え, 吸光度を測定する。ELISA は高感度で, 多数検体を処理できるが, 非特異的反応がみられる。AHA の ELISA キットも市販されている。

c. IB 法

ヒストンを 15-18% の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分画後, ニトロセルロースフィルターに転写し, 最初にフィルターを患者血清, 次いでアルカリホスファターゼ標識抗ヒト IgG と反応させ, 発色反応により抗体を検出する。本法は感度と特異性が高く, 各亜分画特異抗体が検出できるが, 手技が複雑でスクリーニングには適さない。

5. 基準値

健常人では陰性。

6. 臨床的意義(異常値を示す疾患)

a. 薬剤誘発性ループスと SLE

三段階蛍光抗体法では, AHA が SLE では 35% に陽性であるのに対し, DLE では 96% と高頻度であることが報告された。Rubin らは RIA を用い SLE における AHA の対応抗原は H2A-H2B 複合体であると⁴⁾, Portanova らはプロカインアミド誘発性ループスでは SLE と同様に H2A-H2B 複合体と強く反応するが⁸⁾, ヒドララジン誘発性ループスでは H2A-H2B とともに H3-H4 複合体とも弱く反応することを示した⁹⁾。いずれの DLE でも IgG より IgM 抗体価が高かった。その後, Totoritis らは ELISA で, 症候性プロカインアミド誘発性ループスでは IgG 型抗 H2A-H2B 抗体を産生されるが, キニジンやヒドララジンによる DLE では同抗体は陰性となることを示した⁹⁾。

しかし, 各亜分画に対する AHA の反応性は IB 法では RIA や ELISA の成績と異なる。Hardin らは IB 法で SLE 血清 24 例中 11 例 (46%) に AHA を見だし, H1 と H2B に主要エピトープが存在するとした⁷⁾。更に, 抗原エピトープは H1 の

C 末側, および H2B の N 末側に存在し, ヌクレオソーム外部の露出部位にあることを示した。著者らの IB 法による検討でも, 各亜分画特異抗体陽性率は, 抗 H1d/e, 抗 H1c, 抗 H1⁰, 抗 2B, 抗 H3, 抗 H4, 抗 2A 抗体の順に高く, 特にいずれかの H1 蛋白を認識する患者全血清が H1d/e と反応しており, H1d/e にユニバーサルエピトープが存在することが示された⁹⁾。

Craft らは IB 法で DLE における各亜分画に対する AHA の反応性を検討した⁹⁾。プロカインアミド誘発性ループスと SLE はともに H1 および H2B と, 一部は H3 とも反応したが⁸⁾, H2A および H4 との反応はまれであった。一方, ヒドララジン誘発性ループスでは各亜分画と広く反応し, H3, H2A, H4 との反応も多くみられた。興味深いことに, ヒドララジン誘発性ループスの AHA はヒストン分子中央の球状部位 (トリプシン抵抗性の疎水性部位) を認識するのに対し, SLE およびプロカインアミド誘発性ループスではヒストンの N 末端か C 末端近傍 (トリプシン感受性の親水性部位) を認識し, 両者の抗原エピトープが異なることが示された。IB 法を用いた Portanova らの報告は Craft らの成績を一部支持するが, プロカインアミド誘発性ループスでは H2A-H2B 複合体のトリプシン抵抗性部位に対する抗体が一般的だとしている¹⁰⁾。

Hardin および Craft らの成績は, SLE およびプロカインアミド誘発性ループスでは AHA はヌクレオソームの露出部位と反応することから, 正常なヌクレオソーム構造が抗原となり, またヒドララジン誘発 DLE では変性したクロマチンが自己抗体産生に関与する可能性を示しており, 両者の発症機序の違いを示唆する。しかし, AHA の対応抗原エピトープの報告は一定せず (表 1), DLE の診断や抗体検出法の統一など検討を要する。

b. 他疾患における抗ヒストン抗体

AHA は SLE と DLE 以外の膠原病でも広く検出される。関節リウマチでは AHA の頻度は 5-15% と低いが, Felty 症候群や血管炎合併例では高頻度である。若年性関節リウマチでは抗核抗体陽性例, プドウ膜炎合併例で陽性率が高い。

表 1 SLE と DLE における AHA の対応抗原エピトープ

報告者(年)	測定法	SLE	DLE	
			プロカインアミド	ヒドララジン
Rubin ら ⁴⁾ (1982)	RIA	H2A-H2B	H2A-H2B	H2A-H2B, H3-H4
Hardin ら ⁷⁾ (1983)	IB	H1(C末端), H2B(N末端)		
Craft ら ⁹⁾ (1987)	IB	H1, H2B, H3 (親水性部位)	H1, H2B, H3 (親水性部位)	全ヒストン (疎水性部位)
Portanova ら ¹⁰⁾ (1987)	IB	全ヒストン (親水性部位)	H2A-H2B (疎水性部位)	H3, H4 (疎水性部位)
Suwa ら ⁸⁾ (2004)	IB	H1(d/e, c, 0), H2B		

IB: 免疫プロット

また、肺小細胞癌合併亜急性知覚神経症で、ヒストンH1パリアントに対するAHAが検出されたとの報告がある。

のとする説がある。この説には異論もあるが、DLEではLE細胞陽性率が高い。

抗ssDNA抗体はAHAと併存しやすく、DLEでの陽性率が高い。

7. 関連検査項目

AHAはLE細胞形成に必要なLE因子そのも

□ 文献

- 1) Hardin JA: Arthritis Rheum 29: 457-460, 1986.
- 2) Amoura Z, et al: Arthritis Rheum 37: 1684-1688, 1994.
- 3) Kaliyaperumal A, et al: J Immunol 168: 2530-2537, 2002.
- 4) Rubin RL, et al: Arthritis Rheum 25: 779-782, 1982.
- 5) Portanova JP, et al: Clin Immunol Immunopathol 25: 67-79, 1982.
- 6) Totoritis MC, et al: N Engl J Med 318: 1431-1436, 1988.
- 7) Hardin JA, Thomas JO: Proc Natl Acad Sci USA 80: 7410-7414, 1983.
- 8) Suwa A, et al: Arthritis Rheum 48: S228, 2004.
- 9) Craft JE, et al: Arthritis Rheum 30: 689-694, 1987.
- 10) Portanova JP, et al: J Immunol 138: 446-451, 1987.

トピックス

II. 治療

4. ステロイド薬の使い方の実際

諏訪 昭

要 旨

ステロイド薬は、強力な抗炎症作用、免疫抑制作用を有し、膠原病の種々の病態に対する基本的な治療薬である。ステロイド薬にはいろいろな種類があり、各薬剤の作用時間、薬理作用などの特徴から、症状、病態にあわせて、これらを使い分ける必要がある。また、投与量、投与方法を工夫し、必要量を最短期間用いることで、最大の効果を引き出し、副作用を最小限に抑えることが可能となる。実践的なステロイド薬の使用法をまとめた。〔日内会誌 94：2092～2098, 2005〕

Key words：炎症，膠原病，ステロイド，治療，免疫

はじめに

ステロイドホルモンは、生体内における生命活動の維持に必須の生理活性物質であり、糖質コルチコイド、鉱質コルチコイド、性ホルモンがある。糖質コルチコイドは、副腎皮質から分泌され、糖・蛋白代謝に関与するとともに、抗炎症効果を有する¹⁾。ステロイド薬は、このステロイドを人工的に合成したものである。1949年にHenchらは、関節リウマチ(rheumatoid arthritis; RA)患者にステロイド薬を用い劇的な効果を得て、翌年ノーベル賞を受賞した。しかし、用いられたコルチゾン²⁾は、糖質コルチコイドとともに電解質作用を有し、高血圧、浮腫、心不全などの副作用を来した。その後、副作用を軽減し、効力を増強する目的で多くの合成ステロイド薬が開発され、抗炎症薬、免疫抑制薬として膠原病を始め多くの疾患に用いられてきた。

本稿では、糖質コルチコイドを中心に、作用

機序、生理作用と薬理作用、種類と分類、適応・投与方法、薬物相互作用、副作用への対策などについて解説する。

1. 作用機序

脂溶性であるステロイド薬は標的細胞に拡散により受動的に移行し、細胞質内においてステロイド受容体スーパーファミリーに属する特異的受容体と結合する。その後、大きく以下の二つの機序によって、作用を現す。第一の機序では、受容体はステロイド結合後構造変化をきたし、熱ショック蛋白を解離し活性化ステロイド受容体複合体として核内に移行する。この複合体は、標的遺伝子プロモーター内に存在するGRE (glucocorticoid responsive element) と呼ばれるDNAの特異的結合部位に結合することで、抗炎症蛋白リポコルチンなどの様々な蛋白の合成を調節し、抗炎症作用や代謝作用といった薬理作用を引き起こす。第二の機序では、ステロイド受容体が、炎症、免疫に関わるサイトカインや接着分子の合成を促進する転写因子を抑制する

すわ あきら：慶應義塾大学内科

ことで、抗炎症作用や免疫抑制作用をきたす。すなわち、ステロイド受容体は転写因子AP-1 (activating protein-1) やNF κ B (nuclear factor κ B) と結合し、コラゲナーゼ、インターロイキン-2(IL-2), IL-6, IL-8, 腫瘍壊死因子- α (TNF- α), 顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)などのサイトカイン, 細胞間接着因子-1(ICAM-1), 内皮細胞白血球接着因子-1(ELAM-1)などの接着分子やIL-2受容体の合成を抑制する。また, ステロイド受容体はNF κ Bを不活性化するI- κ B (inhibitory- κ B)の合成を促進する²⁾。

2. 生理作用と薬理作用

ステロイド薬には、ステロイドの生理作用である糖新生, 蛋白異化, 下垂体・副腎皮質系の抑制, 男性化, 抗精神神経作用, 脂質代謝異常, 電解質代謝異常と, 抗炎症作用や免疫抑制作用などの薬理作用がある。目的とする薬理作用以外は副作用となるため, 選択的に抗炎症作用や免疫抑制作用を発揮することが, 理想的と考えられ, ステロイド薬が開発されてきた。たとえば, プレドニゾロン(prednisolone; PSL)はヒドロコルチゾンの4倍の糖質コルチコイド作用をもつが, 電解質コルチコイド作用は0.8倍に抑えられている。さらに, メチルプレドニゾロン(methylprednisolone; mPSL)では, 電解質コルチコイド作用は完全に抑えられている。しかし, 電解質コルチコイド作用を除き, 糖代謝, 脂質代謝に対する作用は分離されていない。抗炎症作用は, (1)白血球の遊走の抑制, (2)白血球および線維芽細胞, 血管内皮細胞の機能抑制, (3)種々の炎症性サイトカインや蛋白分解酵素, ホスホリパーゼA2産生抑制やシクロオキシゲナーゼ2(Cox2)発現抑制を介したプロスタグランジンなどの炎症メディエーターの産生抑制による。こうした抗炎症過程に特異的に作用する薬剤や, 転写因子AP-1やNF κ Bの活性阻害作用を有する薬剤の実用化が期待される。

3. 種類と分類

主なステロイド薬の構造と作用を表1に示す¹⁾。ステロイド骨格のいくつかの炭素部位に二重結合, メチル基やフッ素などを導入することにより, 糖質コルチコイド作用や電解質コルチコイド作用に差を生じる。各薬剤の作用時間, 薬理作用などの特徴をもとに, 症状, 病態にあわせて, これらを使い分ける。ステロイド薬のもつ糖質コルチコイド作用と抗炎症活性はほぼ比例する。一般に血漿消失半減期が長い薬剤は, 受容体との結合が強く, 生物学的推定半減期も長い。このため, 同じ力価でも半減期が長い薬剤により強力な持続的な抗炎症効果が得られる。一方で, 抗炎症作用と副腎機能抑制作用は平行し, 半減期が長い薬剤は副腎萎縮を来しやすく, 注意する。

コルチゾール(ヒドロコルチゾン)はヒト副腎皮質より分泌される糖質コルチコイドであり, 健常成人における分泌量は20mg程度である。鉱質コルチコイドであるアルドステロンの400分の1という強い電解質コルチコイド作用を有するため, 抗炎症作用を目的とする治療では用いられない。コルチゾンには糖質コルチコイド作用がないが, 体内で速やかにコルチゾールに変換され作用する。コルチゾールの0.7倍の糖質コルチコイド作用と電解質コルチコイド作用を有する。PSLはコルチゾールのC1, C2間に二重結合を導入することにより, 糖質コルチコイド作用を増強し, 電解質コルチコイド作用を減弱したものである。プレドニンは, コルチゾンのC1, C2間に二重結合を導入したもので, コルチゾンと同様に体内で速やかにPSLに変換され作用する。PSLは本邦で, プレドニンは欧米で汎用されている。PSLは, 糖質コルチコイド作用は中等度, 電解質コルチコイド作用は軽度で, 生物学的半減期は中等度と, 临床上使用しやすく, 中心的な薬剤となっている。電解質コルチコイド作用

表 1. 合成ステロイドの

薬品名	化学構造の変更 (ヒドロコルチゾンを基準として)	糖質コルチコイド作用
短時間作用型		
コルチゾン	C11 = O	0.7
ヒドロコルチゾン		1
中間型		
プレドニゾン	C1 = C2	4
プレドニゾン	C1 = C2, C11 = O	4
メチルプレドニゾン	C1 = C2, C6...CH ₃	5
トリアムシノロン	C1 = C2, C9...F C16...OH	5
長時間作用型		
パラメタゾン	C1 = C2, C6...F, C16...CH ₃	10
デキサメタゾン	C1 = C2, C9...F C16 α ...CH ₃	25
ベタメタゾン	C1 = C2, C9...F, C16 β ...CH ₃	25

は少ないが、20~30mg/日以上では、浮腫、高血圧、低カリウム血症に注意する。mPSLは電解質コルチコイド作用を減弱したものであり、ステロイドパルス療法に際して用いられる。トリアムシロロンは糖質コルチコイド作用を増強し、一方電解質コルチコイド作用を消失させている。パラメタゾンはPSLのC6にフッ素、C16にメチル基を導入したもので、電解質コルチコイド作用はほとんどない。PSLのC9にフッ素、C16 α にメチル基を導入したものがデキサメタゾンで、C9にフッ素、C16 β にメチル基を導入したものがベタメタゾンである。ともに強力な糖質コルチコイド作用を有する。

4. 投与方法

薬剤を効率よく必要なところへ配送するシステムはdrug delivery system (DDS) といい、剤型や投与経路に工夫がなされている。さらに、ステロイド薬の強力な薬理作用に伴う副作用を軽減する改良が加えられている¹⁾。膠原病治療に用いられるステロイド薬は、経口薬、坐薬、注射薬、外用薬に剤型別に分類され、投与方法には、

経口、経静脈、筋肉内、関節腔内、経皮投与がある。

1) 経口投与

全身投与方法として、経口投与が一般的である。いずれの経口薬もほぼ100%体内に吸収される。ステロイド薬の吸収速度は速く、投与後1時間以内に血中濃度は高値に達する。錠剤は、1錠中に成人健常人の分泌量に相当するステロイド(ヒドロコルチゾン 20mg)を含有するが、投与量の微量調節を目的としたPSL 1mg錠もある。散剤は、錠剤の服用が困難な例や微量調節を目的に使われる。PSLを基本とするが、mPSLやベタメタゾン、デキサメタゾンが用いられる場合もある。経口投与では、連日分割投与が一般的であり、1日量を分1~4回連日投与する。初回投与量は、重症または難治性病態では大量(PSL 40~60mg/日)を用い、症状・病態に応じて、中等量(PSL 20~40mg/日)、少量(PSL 5~20mg/日)と投与量を調節する。最初に十分量を投与し、2~4週間程度継続し、以後漸減する。隔日投与方法では、2日に朝1回ステロイド薬を服用する。副作用の軽減が期待できる一方で、十分な抗炎症作用が得られにくい。また、隔日投与方法は、

構造と作用

電解質コルチコイド作用	1錠中含有量 (mg)	血漿消失半減期 (分)	生物学的推定半減期 (時間)
0.7	25	70	8~12
1	10	70	8~12
0.8	1, 5	150	12~36
0.8	5	200	12~36
0	2, 4	200	12~36
0	4	200	24~48
0	2	200	36~54
0	0.5	200	36~54
0	0.5	200	36~54

副腎抑制による副腎不全からの離脱の際にも有用とされる。一方で、半減期の短いヒドロコルチゾンや、逆に長いデキサメタゾンは、隔日投与に向かない。

2) 経静脈投与

経口投与不能例や急速に血中濃度を高めることが必要な重症病態では、経静脈投与が行われる。静脈法では、速やかな効果発現とともに、腎からの排泄も早く、作用時間は短い。難治性病態に対して行われるステロイドパルス療法では、mPSL (1回 500~1,000mg) を5%糖液に溶解し1時間以上かけて点滴投与する。3日連続を1クールとし、以後経口投与のPSL 60mg/日に切り替える。無効例では、効果をみながら2~4週毎に繰り返す。大量ステロイド (PSL換算で1mg/kg以上) の投与は、細胞質に存在するほぼ全てのステロイド受容体を飽和できると考えられ、ステロイド血中濃度が24時間以上維持されることや受容体を介さない作用による効果発現も想定される。ステロイド総投与量を減じる目的で、後療法をPSL中等量や直前の投与量とする投与方法 (ステロイドミニパルス療法) が行われることもある。パルミチン酸デキサメタゾンは、

デキサメタゾンを脂肪粒子内に注入した静注製剤である。本剤はステロイドの乳剤化のため、体内では選択的に炎症部位に集積することから、RA患者において、2週間に1回の投与で効果が持続し、副作用の軽減が期待される。

3) 筋肉内投与

筋肉内投与に際しては、アセテート、アセトナイド懸濁液が主に用いられる。吸収が遅い反面、体内での代謝や排泄も遅く、高い血中濃度を長く維持することができる利点がある。RA患者では酢酸トリウムシロノンの筋注を行う。

4) 関節腔内投与

RA患者の関節炎に対して関節腔内注射が行われる。関節腔内注入により確実に早期の鎮痛、抗炎症効果が1~2週間持続する。全身投与に比して、副作用の頻度は少ないが、関節の破壊や感染のリスクなどに留意し、4~6週の間隔を空ける。難溶性の酢酸メチルプレドニゾン、酢酸ハロプレドン、酢酸トリウムシロノンなどの酢酸エステルが用いられる。

5) 経皮的投与

ファルネシル酸プレドニゾンは、関節腔内に浸透し効果を発現する経皮吸収型の外用薬で、

RAへの適応をもつ。

5. 減量・離脱の進め方

ステロイド薬を使用する上で重要なことは、最大限の薬理効果を引き出しつつ、いかに副作用の発現を少なくするかという点である。そのため、ステロイド薬の減量、離脱法が重要となる。主なものとして、漸減投与法、朝1回投与法、隔日または間歇投与法、ACTH(adrenocorticotropic hormone)投与法、免疫抑制薬併用療法、非ステロイド性抗炎症薬併用法などがある¹⁾。

漸減投与法は最も一般的に行われている。急激な減量は症状の再燃、増悪など反跳現象(リバウンド)を招くこともあり、経験的に、1~2週間でおよそ10%程度が減量の目安とされる。ステロイド薬の維持量は、症例により異なるが、抗炎症作用はPSL換算量5~10mg以上でもたらされ、この量が維持量の目安となる。維持量投与は、副腎皮質からの糖質コルチコイド分泌低下の代償と下垂体抑制からの回復をもたらす。維持量から完全離脱までは、さらに慎重に少量ずつ時間をかけて減量を進める。副腎皮質予備能を調べる目的で、ACTH刺激試験を行うこともある。隔日投与は副作用が少ないとされるが、抗炎症、免疫抑制作用も低減される。

6. 薬物相互作用

ステロイド薬と他の薬剤との薬物相互作用を表2にまとめた。リファンピシンは、肝ミクロゾーム系薬物代謝酵素(CYP3A4)を誘導し、ステロイド薬の代謝を亢進させ、結果としてその効果は減弱する。したがって、こうした薬物相互作用を考慮した治療計画が必要となる。例えば、肺結核症でリファンピシンを服用する際には、ステロイド薬の効果減弱を考慮し、ステロイド薬投与量を倍量とする。

表2. ステロイドの主な薬物相互作用

ステロイドの作用に影響を及ぼす薬剤	
ステロイドの作用を減弱	リファンピシン バルビツール酸系製剤 カルバマゼピン フェニトイン エフェドリン
ステロイドの作用を増強	シクロスポリン エストロゲン製剤
ステロイドによって作用が影響をうける薬剤	
作用が減弱される薬剤	サリチル酸系薬剤 経口糖尿病薬 ワルファリンカリウム イソニアジド
作用が増強される薬剤	シクロスポリン 経口避妊薬
その他の副作用を認める薬剤	
低カリウム血症 感染症	サイアザイド系利尿薬 免疫抑制薬 生ワクチン
消化性潰瘍	非ステロイド性抗炎症薬

7. ステロイド薬の副作用とそのモニタリングおよび対策

ステロイド薬の主な副作用とそのモニタリングおよび対策を表3にまとめた。ステロイド薬の副作用は、きわめて多彩であるが、投与量と期間に依存して発現頻度と重症度が増してることが多い。したがって、必要量を最短期間使用するとともに、十分なモニタリングを行い適切な予防および治療を行う。

1) 易感染性

膠原病患者では、原病の免疫学的異常を背景とし、ステロイド薬の使用による生体防御能低下から易感染性をきたす。感染症には、真菌、結核菌、細菌、ウイルス感染症があるが、発症のリスクは、投与量と期間に依存する。厚生労働省免疫疾患の合併症とその治療法に関する研究班(橋本博史班長)は、ニューモシステイス肺炎の危険因子を検討し、予防基準を提唱している(表4)³⁾。

表 3. ステロイド薬の主な副作用とそのモニタリング, 対策

主な副作用	モニタリング	主な対策
●易感染性 (真菌, 結核菌, 細菌, ウイルス)	赤沈, CRP, 白血球数, β -D グルカン, 抗結核菌抗体, 各種ウイルス抗体, CMV アンチゲネミア, 各種細菌検査 胸部 X 線検査, 各種画像検査	ST 合剤, イソニアジド
●消化性潰瘍～出血	便潜血検査, 末梢血検査, 消化管内視鏡検査	抗潰瘍薬, 粘膜保護薬
●肺炎	血中アミラーゼ, 腹部超音波検査	蛋白分解酵素阻害薬
●糖尿病	血糖, HbA1c, 尿糖	食事療法, インスリン注射薬
●高脂血症, 動脈硬化	総コレステロール, LDL-コレステロール	抗高脂血症薬
●浮腫, 電解質異常	体重, ナトリウム, カリウム	利尿薬
●高血圧, うっ血性心不全, 不整脈	心電図, 心エコー検査	降圧薬
●副腎不全・離脱症候群	コーチソール, ACTH 試験	ステロイド補充療法(ステロイドカバー)
●骨粗鬆症および病的骨折	骨代謝マーカー, 脊椎 X 線検査, DEXA	ビタミンD, ビスホスフォネート
●無菌性骨壊死	大腿骨 MRI 検査, 骨シンチグラフィ	
●成長障害	身体計測	
●ステロイド筋症(ミオパチー)	徒手筋力テスト	
●血栓症	凝固・線溶系検査	抗血小板薬
●白血球増多	末梢血検査	
●精神障害	精神科的診察	向精神薬
●白内障, 緑内障	眼科的診察	
●月経異常, 更年期症状促進	婦人科的診察	
●多毛, 皮下出血, にきび, 皮膚線条, 皮膚萎縮, 発汗増大	皮膚的診察	皮膚外用薬
●食欲亢進, 異常脂肪沈着 (中心性肥満, 満月様顔貌, 野牛肩)		食事療法

2) 骨粗鬆症

ステロイド性骨粗鬆症は, 続発性骨粗鬆症の主要な要因である。骨粗鬆症誘発のメカニズムの一つは, 骨芽細胞のアポトーシス促進による寿命短縮や機能低下が関与する骨形成低下である。もう一つは, 破骨細胞による骨吸収促進である。これには, 腸管でのCa(カルシウム)吸収低下や尿細管でのCa再吸収低下による副甲状腺機能亢進症や性腺機能低下に加え, 破骨細胞のアポトーシス抑制による寿命延長も関わる⁴⁾。厚生労働省免疫疾患の合併症とその治療法に関する研究班では, 熊谷らがステロイド性骨粗鬆症の横断研究と骨粗鬆症予防に関するビタミンD3とビスホスホネートの無作為比較試験を行った。その結果をふまえ, 骨密度が若年成人平均値(YAM)の80%未満を治療の絶対適応とし, 骨密度が正常でも骨折のリスクがあることを勧

告した(副腎皮質ステロイド大量使用女性患者の骨折予防と治療に関する提言2004)⁵⁾。

8. その他の注意すべき点

高齢者では, 糖尿病, 高血圧, 骨粗鬆症などの危険因子をもつことが多く, 副作用の発現に注意すべきである。小児では, 成長障害に注意し, 最小限の投与量, 投与期間とする。

妊婦に対して, 催奇形性, 流早産誘発, 胎児の下垂体・副腎機能不全などの副作用はヒトでは証明されていないが, 胎盤の機能不全の可能性は指摘されており, 慎重に使用すべきである。PSLは胎盤で不活化されるため, 通常量では妊娠中も比較的安全である。したがって, 原病のコントロールのために必要量を使用すべきである, 授乳中には, 母親の服用したステロイド薬の一

表 4. 免疫疾患におけるニューモシスティス肺炎予防基準

一次予防	
●年齢 50 歳以上	
●ステロイド薬投与例	PSL 1.2mg/Kg/ 日以上 あるいは PSL 0.8mg/Kg/ 日以上で免疫抑制薬使用 中止基準 PSL 0.4mg/Kg/ 日以下
●免疫抑制薬投与例	PSL 0.8mg/Kg/ 日以上併用 あるいは 末梢血リンパ球数 500/ μ l 以下 中止基準 PSL 0.4mg/Kg/ 日以下併用 あるいは 安定して末梢血リンパ球数 500/ μ l 以上
二次予防	
●発症例全例	
中止基準	一次予防と同じ
* 予防法	
(1) ST 合剤 (TMP/SMX) 1.0g/ 日 ~ 4.0g/ 週 (2.0g/ 回) ~ 8.0g/ 週 (4.0g/ 回)	
(2) イセチオン酸ペンタミジン吸入 300mg/ 月 ~ 300mg/2 週	
(文献 3 より引用, 一部改変)	

部は新生児へ移行する。薬剤服用後、少なくとも 4 時間は授乳を避ける、長時間作用型の薬剤は使用しない。

おわりに

ステロイド薬は、膠原病治療において中心的役割を果たすが、使い方によっては副作用のため患者を苦しめることとなる。その特徴を理解し、上手く使いこなし、効果を最大限引き出すとともに、副作用を最小限に抑える努力を続けることが臨床家の務めと考える。

文 献

- 1) 諏訪 昭：ステロイド薬, 外来全科痛み治療マニュアル. 高木 誠, 他編. 第 2 版, 三輪書店, 東京, 2004, 44-68.
- 2) 市川陽一：糖質コルチコイド薬 使い方の要点. 日本内科学会雑誌 86:1394-1399, 1997.
- 3) 猪熊茂子：免疫疾患に合併するニューモシスティス肺炎の予防基準. 厚生労働省免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業 免疫疾患の合併症とその治療法に関する研究班 (橋本博史班長) 平成 14-16 年度研究報告書, 2005, 35-40.
- 4) 諏訪 昭, 他：ステロイド性骨粗鬆症のモニタリングと予防・治療. Medical Practice 22:477-479, 2005.
- 5) 熊谷俊一：ステロイド性骨粗鬆症の予防と治療. 厚生労働省免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業 免疫疾患の合併症とその治療法に関する研究班 (橋本博史班長) 平成 14-16 年度研究報告書, 2005, 41-47.

CASE REPORT

Yuko Kaneko · Akira Suwa · Yasuo Ikeda
Michito Hirakata

***Pneumocystis jiroveci* pneumonia associated with low-dose methotrexate treatment for rheumatoid arthritis: report of two cases and review of the literature**

Received: September 1, 2005 / Accepted: October 19, 2005

Abstract Low-dose methotrexate (MTX) therapy is widely used for rheumatoid arthritis (RA) because of its favorable efficacy and toxicity profile. Although *Pneumocystis jiroveci* pneumonia (PCP) is most often seen in severely immunosuppressed patients, PCP complicating low-dose MTX therapy for RA has been reported to sometimes occur. We herein report two cases of patients who developed PCP during treatment with low-dose MTX, and discuss the importance of prophylaxis for this opportunistic infection.

Key words Methotrexate (MTX) · *Pneumocystis jiroveci* pneumonia (PCP) · Prophylaxis · Rheumatoid arthritis (RA)

Introduction

Low-dose weekly pulse methotrexate (MTX) therapy is most commonly used for rheumatoid arthritis (RA) because of its favorable efficacy to reduce symptoms and prevent progressive structural damage.¹ However, this therapy has been recently implicated as a risk factor for opportunistic infections. *Pneumocystis jiroveci* pneumonia (PCP) is most often seen in severely immunosuppressed patients related to acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and treatment with strong cytotoxic agents or immunosuppressive drugs. In 1983 PCP complicating low-dose MTX therapy for RA was reported.² Due to the wide diversity for the options for the treatment of RA including biological agents, we should take greater care of PCP. We herein describe two patients who developed PCP during low-dose MTX therapy and discuss the importance of appropriate prophylaxis.

Y. Kaneko (✉) · A. Suwa · Y. Ikeda · M. Hirakata
Department of Internal Medicine, Keio University School of
Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan
Tel. +81-3-3353-1211 (ext. 62315); Fax +81-3-5379-5037
e-mail: ykaneko@sc.itc.keio.ac.jp

Case reports

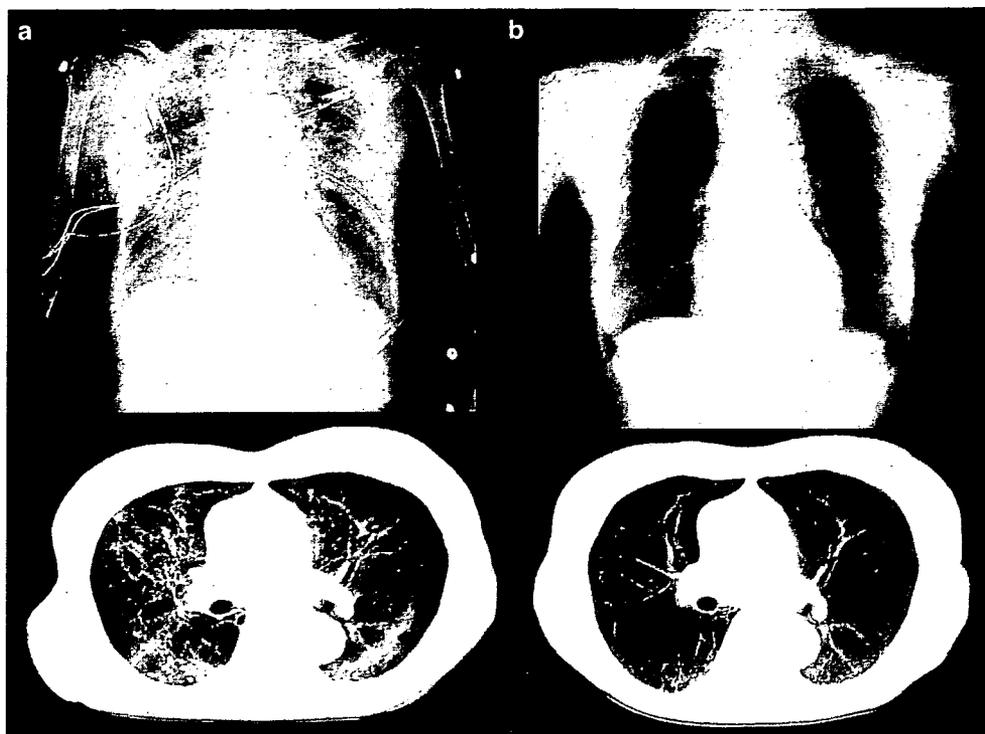
Patient 1

A 68-year-old woman suffering from seropositive RA for 17 years had been treated with MTX in a dosage of 5 mg/week, prednisolone (PSL) 6 mg/day, bucillamine 200 mg/day, and diclofenac 25 mg/day. After 147 months of MTX therapy, she began to complain of fever and dyspnea. On admission her body temperature was 40°C and a lung examination showed bilateral crackles. Laboratory examinations showed: white blood cells (WBC) 13 200/μl (lymphocytes 660/μl), hemoglobin 14.1 g/dl, platelets $20.7 \times 10^4/\mu\text{l}$, lactate dehydrogenase (LDH) 480 IU/l, C-reactive protein (CRP) 11 mg/dl, IgG 938 mg/dl, β-D-glucan >600 pg/ml, KL-6 749 U/l. Her arterial blood gas analysis (BGA) showed type I respiratory failure (PaO₂ 52 torr, PaCO₂ 27 torr, pH 7.57). A chest radiograph revealed bilateral ground-glass infiltrates and reticular shadows (Fig. 1). A polymerase chain reaction (PCR) assay of bronchoalveolar lavage (BAL) fluid showed *Pneumocystis* (PC). Aerobe, anaerobe, and fungal cultures of lavage fluid and cytomegalovirus (CMV) antigenemia were negative. Methotrexate was immediately discontinued, and high-dose trimethoprim sulfamethoxazole (TMP-SMX) and methylprednisolone (mPSL) pulse therapy was administered, resulting in both a clinical and radiographic improvement.

Patient 2

A 73-year-old woman suffering from malignant RA for 14 years had been treated with MTX in a dosage of 7.5 mg/week, PSL 16 mg/day, and diclofenac 75 mg/day. After 13 months of MTX therapy, she developed general malaise and gait disturbance. On admission she was afebrile and coarse crackles were audible in the left lung field. Laboratory examinations showed: WBC 4400/μl (lymphocytes 44/μl), hemoglobin 10.4 g/dl, platelets $20.7 \times 10^4/\mu\text{l}$, LDH 512 U/l, CRP 23 mg/dl, IgG 477 mg/dl, β-D-glucan 424 pg/ml. Arterial BGA revealed PaO₂ 25 torr, PaCO₂ 42 torr, and pH

Fig. 1a,b. Chest X-ray and computed tomography. **a** Chest radiographs revealed bilateral ground-glass infiltrates and reticular shadows. **b** The shadows disappeared after treatment with prednisolone and trimethoprim/sulfamethoxazole



7.51, and ventilation support was required. A chest radiograph revealed interstitial and alveolar infiltrations, preferentially in the left lung. Bronchoalveolar lavage fluid revealed PC by Grocott staining. High-dose intravenous TMP-SMX was given for 7 days together with mPSL pulse therapy. TMP-SMX was changed to pentamidine isetionate, since her symptoms were complicated by severe pancytopenia due to TMP-SMX. However, she died of *Aspergillus pneumonia* and disseminated intravenous coagulation 3 weeks later. Autopsy revealed infarctions of multiple organs with intravenous thrombi in addition to diffuse fibrosis in her bilateral lungs.

Discussion

We herein reported two patients who developed PCP during low-dose MTX therapy. A good response was achieved by early diagnosis and combination therapy with TMP-SMX and mPSL in patient 1, while patient 2 was unfortunately complicated with total *Aspergillus* infection caused by a severely immunocompromised state due to concomitant PSL use, hypogammaglobulinemia, and pancytopenia. The prognosis of PCP improved with advanced treatment, but PCP often remains fatal even today.

Since the first report in 1983,² the occurrence of PCP during treatment with low-dose MTX in RA has attracted a great deal of attention. Formerly the PC organism was thought to be a protozoan named *Pneumocystis carinii*, but the organism was later revealed to be a fungus and not related to zoonosis by DNA analysis. As a result, it is now

referred to as *Pneumocystis jiroveci*, which causes pneumonia in humans.³ *Pneumocystis jiroveci* pneumonia is most often seen in severely immunosuppressed patients, related to AIDS and treatment with strongly cytotoxic agents or immunosuppressive drugs. The use of a PSL dose of greater than 30mg/day was reported to be associated with a risk of developing PCP.⁴ Recently, PCP complicating low-dose MTX therapy for RA has been reported to sometimes occur and it thus should be considered in the differential diagnosis for interstitial pneumonitis, including MTX-induced pneumonitis. *Pneumocystis jiroveci* pneumonia is definitely diagnosed by the detection of PC organisms in appropriate respiratory specimens using Grocott methanamine silver staining and an immunofluorescence assay. The PCR technique has been reported to be useful for an early diagnosis. However, the asymptomatic carriage of PC has also been reported in 44% in the patients who receive corticosteroids equivalent to >20mg/day PSL.⁵ The polymerase chain reaction is superior in sensitivity to staining, but inferior in specificity.⁶ Clinical findings, laboratory data, and response to treatment should be considered when confirming the diagnosis. Because the BAL fluid of patient 1 was negative in Grocott staining but positive in PCR, we diagnosed her as having PCP by taking all factors into consideration after we started to administer PSL and TMP-SMX.

The pulmonary adverse effects associated with MTX are reported to occur in 1%–5% of cases,^{7,8} and opportunistic infections, such as PCP, CMV pneumonia, disseminated herpes zoster, cryptococcosis, and widespread nocardiosis^{9–11} have been found to accumulate with the increased use of MTX. Although the mechanisms by which