

深在性真菌症の臨床診断における血中(1→3)-β-D-グルカン測定 —問題点とこれまでの進歩—

吉田耕一郎, 二木 芳人, 岡 三喜男

はじめに

医療技術の高度化に伴う免疫不全患者の増加, 人口の高齢化, HIV感染者の蔓延などにより, この様な患者に合併し易い深在性真菌症の臨床的重要性は高まっている. 風土病的な真菌症も少なくない米国と異なり, わが国ではカンジダ属やアスペルギルス属真菌による日和見感染症が特に重要であり, 近年いくつかの新規抗真菌薬が臨床現場に導入された後も, その死亡率は依然高い状態が続いている. 深在性真菌症の診断は真菌学的に病巣から直接原因真菌を分離するか, 病理組織学的に真菌の組織内侵入像を観察することで確定する. この点は他の感染症と同様であるが, 本症を発症する様な宿主では, 全身状態不良または出血傾向などを認める場合が多く, 気管支内視鏡の様な侵襲的検査を積極的に施行し確定診断に導くことの難しい場合が少なくない. さらに深在性真菌症は急速に病態が進展することも多く, 診断確定まで治療開始を待つことはできないのが現実でもある. そこで実地医療では血清診断法を用いて臨床的に本症を早期に診断し, 早期治療に結びつける努力が行われてきた. この場合の血清診断法は血清中の抗原抗体反応を応用した検査法のみではなく, 真菌の代謝産物や構成成分を血液およびその他の体液, 肺胞洗浄液中などに検出する手法も広く含んでいる.

ただし血清診断法は早期診断に有用ではあるが, 診断の補助として用いるべきである. すなわち治療開始の基準あるいは効果判定の指標と

して用いることはできるが, これのみでは診断を確定することはできない. また, 各々の検査の精度にも限界があり, 必ずしも十分に満足できる成績が得られないのが現状である. したがって深在性真菌症発症のハイリスク患者では, いくつかの血清診断法を組み合わせ, 定期的に測定を行うことで検査の精度を高めるなどの工夫が必要である.

我々は様々な深在性真菌症血清診断法の臨床評価を行ってきたが, 特に(1→3)-β-D-グルカン(β-グルカン)測定の臨床応用における問題点を浮き彫りにし, その対策について論じてきた. 本稿では, 我々が深在性真菌症診断におけるβ-グルカン測定の有用性や問題点を明らかにし, その問題解決に直結する方法の開発に至るまでを紹介する.

1. (1→3)-β-D-グルカン測定

リムルス反応を応用する血中β-グルカン測定は深在性真菌症発症のハイリスク患者において, 本症のスクリーニングのために繰り返し検査される場合が多く, わが国の深在性真菌症診療において欠かすことの出来ない検査法の1つとなっている.

血中β-グルカン測定には現在までに複数の異なるキットが臨床現場で使用されてきた. 1995年, 最初に過塩素酸(PCA)処理-発色合成基質エンドポイント法によるβ-グルカン測定キットが登場し, 優れた感度で深在性真菌症の早期診断に有用と高く評価された. その後, 前処理法や測定方法の異なるキットが相次いで開発された. アルカリ処理-発色合成基質カイ

ネティック法, アルカリ処理-発色合成基質エンドポイント法, 希釈加熱-比濁時間分析法, 希釈加熱-発色合成基質エンドポイント法の4種類のキットである。

リムルス反応を応用し, カプトガニの血液凝固反応カスケードのG因子をβ-グルカンが活性化する原理はいずれも同一であるが, 検体前処理法, 実際の測定方法, 直接測定対象物質, 標準β-グルカンなどが異なっている (Fig. 1)。また検体処理能が高く民間の検査センターなど大量に検体を扱う施設で使用しやすいキットや, 1検体から測定可能で病院検査部での使用が適しているキットなど, 各キットはそれぞれに特徴を有している。

2. 研究の背景

1995年頃, 当病院で使用していたキットで, 臨床経過と合致しない偽陽性と思われる症例に気付いた。炎症反応は正常で発熱はなく, 深在性真菌症は否定的であるにも拘わらず, 血中β-グルカン値は高値を示していた。調べてみると, この他にも同様のβ-グルカン異常高値を呈する数例を抽出できた。当時, 学会でも深在性真菌症診療におけるβ-グルカン値測定の有用性に関する報告が相次いで発表されていた。

私たちは血中β-グルカン値測定の有用性を認識しながらも, 原因不明の血中β-グルカン偽陽性の症例を抱え, 測定値の評価に頭を悩ませた。また検体によって, 測定キット間で測定値および判定結果に不一致が生じていた。感度が低いキットを用いた場合, 偽陰性が生じ治療開始の遅れにつながる。これは患者にとって極めて重大な不利益である。一方, 特異度の低いキットを用いて検査を行った場合, 偽陽性が多く出現するため不必要な抗真菌薬が開始され問題となる。同一物質を血中で測定しているにも拘わらず, 測定キットにより結果に大きな乖離が生じる原因は何か, また解決法はどこにあるのか, 偽陽性の生じる原因は何か, 我々の研究はこのような臨床的疑問点から開始された。

3. β-グルカン測定における偽陽性

β-グルカンは様々な分子量の多糖であり, 環境に幅広く分布している。天然素材を使用した透析膜, アルブミンやグロブリンなどの血液製剤, ガーゼなどの中にはβ-グルカンを含有しているものがある。またレンチナンなどβ-グルカンそのものを製剤化した薬品もあり, この様な医療用品由来のβ-グルカン汚染のため測定値が高値となる場合がある。また検体取り扱いの

不手際で自然界のβ-グルカンが混入した場合にも異常高値を呈する。このような問題が存在することはあらかじめ知られていた。β-グルカン測定キットは深在性真菌症の体外診断薬であり, この様な環境のβ-グルカン汚染により陽性結果を示すことは臨床的に偽陽性と判断される。しかしながら, 真菌に由来しないβ-グルカンもG因子を活性化するのでリムルス反応は正常に進む。したがって臨床的には偽陽性であっても, 厳密にはβ-グルカン値を正しく測定していることとなる。

初期に問題視したβ-グルカン

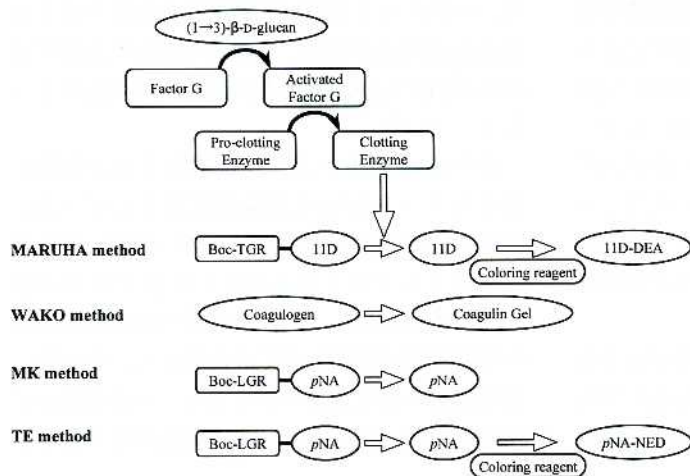


Fig. 1. The Limulus cascade reaction followed by the reactions of respective β-glucan measurements. Excluding PCA pretreatment-chromogenic endpoint method.

偽陽性症例は、この様な真菌以外のβ-グルカンによる偽陽性を生じる既知の因子はないと判断できた。したがって偽陽性の原因はこれ以外にあると考えたが、当初臨床の側からこの疑問を解く鍵は見つからなかった。その後、溶血検体や高γグロブリン検体ではβ-グルカン測定時、反応液中に非特異的な混濁が生じてβ-グルカン異常高値を呈するもののあることがわかってきた。稲田ら¹⁾は基礎的検討で、前処理としてアルカリ処理を行うキットにおいて、溶血やγグロブリンを多量に含有する検体で蛋白が不溶化して析出し、リムルス反応を介さず非特異的に反応液の吸光度を上昇させ、偽陽性を生じさせることを報告している。この様にβ-グルカン測定における偽陽性には、真菌以外のβ-グルカンによる偽陽性と非特異反応などによる偽陽性がある。

4. 非特異反応の出現頻度

偽陽性の原因の1つとして、我々はβ-グルカン測定系でβ-グルカン以外の非特異反応が出現している可能性に着目して検討を始めた。臨床現場で最も使用されているβ-グルカン測定キットは、アルカリ処理-発色合成基質カイネティック法(ファンギテック G テスト MK; MK 法)と希釈加熱-比濁時間分析法(β-グルカンテストワコー; ワコー法)であり、まずこの2種類のキットの性能を評価した²⁾。1999年1月から5月まで、川崎医科大学附属病院で深在性真菌症を疑い、もしくは深在性真菌症の治療経過観察目的で血中β-グルカン値が測定されていた146例の保存血漿343検体を材料として、血中β-グルカン値を両方法で測定し、深在性真菌症の確定群、疑診群、否定群で検討した。また非特異反応の関与を検証するため、カルボキシメチル化カードラン(CMカードラン)を反応系に過剰添加し、リムルス反応を抑制

しβ-グルカン測定を行った。β-グルカンの一種であるCMカードランを反応系に過剰添加するとリムルス反応が停止し、β-グルカン値は算出されず、測定値は理論的に検出限界以下となることが知られている。この条件下で算出されてきた数値は、β-グルカン以外の非特異反応を検出した結果であると判定できる。両者の測定値は緩やかな相関を示した(Fig. 2)が、MK法ではワコー法よりも高い数値を示す傾向にあり、深在性真菌症否定群においても陽性検体が多い結果であった。感度と特異度は各々MK法で87.9%、43.3%、ワコー法では72.9%、75.2%と、感度はMK法が、特異度はワコー法が優れていた。またワコー法ではCMカー

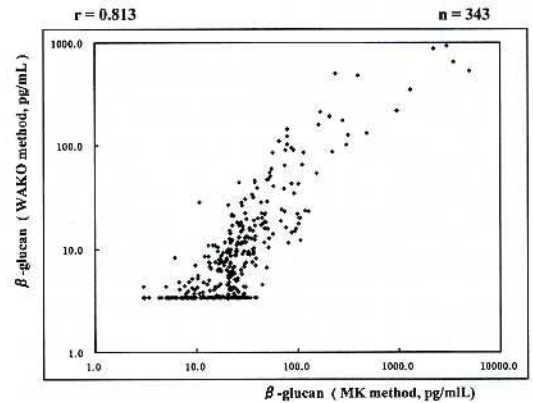


Fig. 2. Comparison between (1 → 3)-β-D-glucan measured by WAKO and MK assay

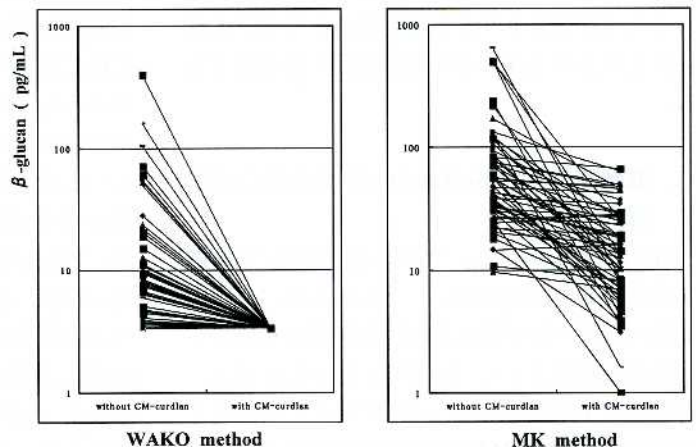


Fig. 3. Comparison between results of β-glucan measured by both methods with or without CM-curdlan

ドランを添加することにより、全ての検体で測定限界以下となったのに対し、MK法ではCMカードラン添加後も測定値が陽性を示す検体を多数認めた (Fig. 3)。これはワコー法では非特異反応は認められなかったが、MK法でβ-グルカン以外の非特異反応を多くの検体 (34.9%) で検出した結果と判定できる。この検討でMK法に偽陽性が多く、測定キット間でβ-グルカン測定値や判定結果に乖離が生じる原因の1つが、非特異反応の検出頻度にあることが推測できた。

別の検討³⁾ではMK法とワコー法に加えて、希釈加熱-発色合成基質エンドポイント法 (β-グルカンテストマルハ; マルハ法) の評価も行った。この検討では、プロテアーゼ阻害剤である安息香酸アミジノフェニル (APB) を用いてリムス反応を停止させた。APB添加により活性型凝固酵素活性が阻害されるため反応が停止し、β-グルカン値は算出されなくなる。MK法とマルハ法を比較したが、MK法では95.1%の検体に非特異反応が出現していたのに対し、マルハ法では非特異反応の出現は全く認められないことが判った。臨床検体を用いた検討のため、非特異反応の出現頻度は、母集団に含まれる症例によりある程度変化するが、これらは日常診療で我々が実際に経験する頻度である。

5. 非特異反応がβ-グルカン測定に及ぼす影響

MK法はワコー法、マルハ法と比して非特異反応の出現頻度が高いことが判った。これが実際の感度や特異度にどの程度影響を及ぼしているのか検討した⁴⁾。2002年8月から9月に、川崎医科大学附属病院でβ-グルカンを測定した患者174例の保存血漿460検体を対象として、APBを用いてβ-グルカン測定反応を停止させ

Table 1. Sensitivity, specificity, the positive predictive value and the negative predictive value in each method before and after correction of non-specific reactions.

	dilution & heating - endpoint method		dilution & heating - turbidimetric method	
	before correction	after correction	before correction	after correction
sensitivity	35.7%	42.9%	28.6%	(-)
specificity	96.0%	96.0%	96.0%	(-)
PPV	45.5%	50.0%	40.0%	(-)
NPV	94.2%	94.8%	93.5%	(-)
	alkaline - kinetic method		alkaline - endpoint method	
	before correction	after correction	before correction	after correction
sensitivity	78.6%	57.1%	57.1%	42.9%
specificity	80.1%	91.4%	84.1%	94.0%
PPV	26.8%	38.1%	25.0%	40.0%
NPV	97.6%	95.8%	95.5%	94.7%

非特異反応相当値を算出した。APBを添加しない通常測定値から非特異反応相当値を差し引いて補正し、補正前後の感度、特異度、陽性適中率、陰性適中率を算出した。検討したβ-グルカン測定キットはMK法、ワコー法、マルハ法、アルカリ処理-発色合成基質エンドポイント法 (ファンギテック G テスト TE; TE法) の4種類であった。この検討における各キットの非特異反応出現頻度は割愛する。非特異反応補正前後の感度、特異度、および陽性的中率・陰性的中率はTable 1に示す通りであった。ワコー法では非特異反応が認められなかったため補正後の数値は示していない。補正前の感度はMK法が78.6%と最も高く、次いでTE法が57.1%であった。しかし非特異反応相当値補正後には各々57.1%、42.9%と感度の低下が認められた。マルハ法、ワコー法の補正前感度は低い結果であった。一方、特異度に関してはマルハ法では補正前後ともに、ワコー法では補正前が各々96.0%と優れていた。補正前のMK法、TE法の特異度は各々80.1%と84.1%であったが、補正により90.7%、93.4%と、約10%の特異度改善が認められた。また陽性的中率はMK法及びTE法において、それぞれ補正前後で26.8%から38.1%、25.0%から40.0%と改善していた。検体の前処理にアルカリ処理を用いるMK法やTE法でβ-グルカン測定時、

非特異反応の出現が検査の性能に少なからず悪影響を及ぼしていることが判った。

6. 非特異反応の問題を解決する

MK法は非特異反応を補正しても、他のキットと比して感度が高い。また簡便性や高い検体処理能力からも臨床現場で最も広く使用されているのはMK法である。したがってMK法の非特異反応の問題を早期に解決する必要があると考えられた。

MK法でβ-グルカン値を測定する際、吸光度変化率をグラフにした反応タイムコースを観察し、非特異反応に特徴的な上に凸の曲線を確認すれば非特異反応を発見できる。しかし、肉眼による微妙な反応タイムコースの識別は困難な場合も多く、また実地医療でのタイムコース確認作業は極めて煩雑であり実際的ではない。そこで反応タイムコースの吸光度変化率から独自に設定した非特異反応インデックスを用いて、タイムコースが非特異反応の影響を受けているか否かの識別を試みた⁵⁾。この結果、非特異反応の有無を識別するインデックスのカットオフ値を0.5と設定した場合、感度88.9%、特異度73.7%、陽性予測値93.5%、陰性予測値60.9%の成績が得られ有用と考えられた。非特異反応インデックスの使用により、アルカリ処理-発色合成基質カイネティック法の問題点であった非特異反応はほぼ判別可能であり、非特異反応に由来した偽陽性による不必要な抗真菌療法を回避できると思われた。しかし、これはβ-グルカン測定における非特異反応出現の根本的問題解決にはならず姑息的な手法である。したがって非特異反応を発生させない新たなβ-グルカン測定キットの開発が求められていた。

我々はMK法を開発した生化学工業㈱と協力し、非特異反応の根本的問題解決に向けての取り組みを開始した。従来MK法で用いられていたアルカリ前処理液の組成は0.15 M KOH-0.3 M KCl-20 mM EDTA-0.1 % Polybreneで

あった。この前処理液のアルカリ成分が検体中の蛋白を変性させることが考えられたため、試行錯誤の結果、MK法の現行アルカリ前処理液の成分構成や濃度を一部変更した改良アルカリ前処理液を調整した。この改良アルカリ前処理液で検体を前処理した後、β-グルカンを測定することにより現行法の測定値との相関性を保ちつつ、非特異反応出現を著しく減少させることに成功した⁶⁾ので、その成績の一部を紹介する。改良アルカリ前処理液は従来型前処理液のアルカリ(KOH)濃度を低下させるとともに、KCl濃度を上昇させ50 mMの濃度でNa₂SO₄を添加した組成、0.05 M KOH-0.6 M KCl-20 mM EDTA-0.1 % Polybrene-50 mM Na₂SO₄である。これを用いて、臨床から得られた血漿200検体のβ-グルカンを測定し、従来の前処理液を用いた測定結果と比較した。200検体中、従来法では139検体で非特異反応がみられ、そのうち7検体でカットオフ値(20 pg/ml)以上の数値を示したが、改良法では非特異反応の出現を認めたものは16検体、カットオフ値以上の数値を認めたものは1検体に減少した(Table 2)。またこの200検体を従来のアルカリ前処理液および改良アルカリ前処理液で前処理した後にリムルス反応不活化剤(ラミナランオリゴサッカライド)添加条件下と無添加条件下でβ-グルカン測定を行い、見かけ値と真値を算出して両者の関係をFigure 4に示した。従来型アルカリ前処理液を使用した場合、見かけ値が真値を上回る検体が多く認められたが、改良アルカリ前処理液を使用した場合には見かけ値は低下し真値との差が縮小した。改良アルカリ前処理液を用いた場合にも、リムルス反応に妨害作用を来さないことは別途確認済みである。改良アルカリ前処理液の開発により、β-

Table 2. Incidence of non-specific reaction in the measurement of (1 → 3) - β-D-glucan

Sample	Non-specific reaction (pg/mL)	Current pretreatment		Improved pretreatment	
		Samples	%	Samples	%
Plasma	0-3.8	61	30.5	184	92.0
samples (200)	3.9-9.9	108	54.0	15	7.5
	10.0-19.9	24	12.0	0	0.0
	20.0=<	7	3.5	1	0.5

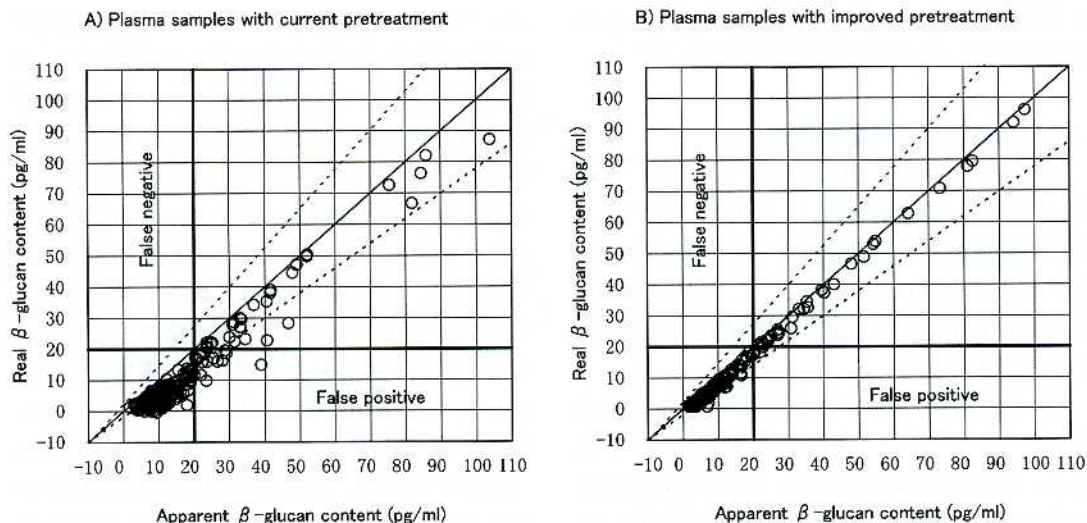


Fig. 4. Comparison of non-specific reactions between the current and improved pretreatment reagents.

Out of 200 plasma samples, 180 plasma samples containing less than 100 pg/mL β -glucan are shown in these figures. Real β -glucan contents were obtained by subtracting non-specific values from apparent values.

グルカン測定の特異反応の出現頻度は著しく減少し、この問題は大きく改善された。2005年7月以降、MK法ではわれわれが開発した改良アルカリ前処理液が使用されている。

おわりに

β -グルカン測定の際に生じる非特異反応の問題に着目し、検討してきた成績の一部を紹介した。現在、改良アルカリ前処理液を採用した新MK法の臨床的性能評価を改めて進めている。

他方、希釈加熱法を前処理に用いるキットの低感度は、 β -グルカン測定におけるもう1つの大きな問題点である。ここではこの問題について触れなかったが、我々のROC解析では、基準値を現行の11 pg/mLから更に引き下げることで、特異度を損なうことなく感度の向上が期待できるとの結果を得ている。こちらについてもさらに臨床的検討を進めていく予定である。

る。

β -グルカン測定は本邦で開発され、臨床応用が行われてきた検査法である。これまで米国の臨床現場は血清診断法そのものを受け入れず、所謂 culture based の検査を重視してきた。しかし2004年、米国でFDAが β -グルカン測定法を承認し臨床応用も開始されている。米国のキットは使用するカプトガニの種類がMK法と異なっているので、基準値の設定に違いがあるものの、基本的にはMK法と同様の考え方に基づいて開発されたキットである。海外からこのキットの優れた成績の報告⁷⁾⁸⁾が発表され始めている。わが国で普及しているキットとの比較検討も今後の課題の1つである。

β -グルカン先進国の臨床医として、今後、さらにこの方法が感度と特異度を向上させて成長し、広く世界に普及して深在性真菌症の早期診断、ひいては予後改善に寄与することを切望している。

文 献

- 1) 稲田捷也, 遠藤重厚: リムルス試薬を用いた血中エンドトキシンおよび β -グルカン定量におけるカイネ

- ティック法での特異反応と非特異反応の判別. 医学と薬学 42:885-897, 1999
- 2) 吉田耕一郎, 二木芳人, 見手倉久治, 他: 測定キット間の血中 (1 \rightarrow 3) - β -D-グルカン測定値不一致の原因に関する検討. 真菌誌 42:237-42, 2001
 - 3) 吉田耕一郎, 二木芳人, 宮下修行, 他: 血中 (1 \rightarrow 3) - β -D-グルカン測定法の非特異反応検出に関する検討. 感染症誌 76:754-762, 2002
 - 4) 吉田耕一郎, 二木芳人, 毛利圭二, 他: アルカリ処理-発色合成基質カイネティック法による血漿中 (1 \rightarrow 3) - β -D-グルカン測定における非特異反応出現とその対策. 感染症誌 78:435-441, 2004
 - 5) 吉田耕一郎, 二木芳人, 毛利圭二, 他: 血漿中 (1 \rightarrow 3) - β -D-グルカン測定法における非特異反応出現に関する検討. 感染症誌 79:329-340, 2005
 - 6) 吉田耕一郎, 二木芳人, 松田淳一, 他: 改良アルカリ前処理法を用いた血中 (1 \rightarrow 3) - β -D-グルカン測定法の基礎的検討. 感染症誌 79:433-442, 2005
 - 7) Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, et al.: β -D-glucan as diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. Clin Infect Dis. 39:199-205, 2004
 - 8) Pazos C, Ponton J, Del Paracio A: Contribution of (1 \rightarrow 3) - β -D-glucan chromogenic assay to diagnosis and therapeutic monitoring of invasive aspergillosis in neutropenic adult patients: a comparison with serial screening for circulating galactomannan. J Clin Microbol 43:299-305, 2005