

総 説

アスペルギルス感染症の血清診断法と (1→3)- β -D-グルカン測定法の進歩

吉 田 耕一郎

川崎医科大学呼吸器内科

要 旨

深在性真菌症の血清診断法はわが国の日常診療で多用されている。中でもアスペルギルス感染症の血清診断法として現在、最も高い信頼性が認められるのはガラクトマンナン抗原を ELISA 法で血中に検出する方法である。ただし近年、本法の測定妨害因子の報告も多く、検査の運用には注意が必要である。これ以外にもいくつかのアスペルギルス抗原または抗体を検出する方法の検討も進められている。一方、深在性真菌症のスクリーニング検査としてわが国で開発された (1→3)- β -D-グルカン測定法は、アルカリ処理–発色合成基質カイネティック法における非特異反応の高頻度出現に伴う偽陽性が問題視されていた。2005年にこの点の改良がなされ、本法の臨床的有用性は向上すると思われる。本稿ではアスペルギルス感染症の血清診断法の最近の流れと、(1→3)- β -D-グルカン測定における非特異反応問題の解明とその測定法の改良に至るまでについて概説する。

Key words: 血清補助診断 (serological surrogate diagnostic marker), アスペルギルス症 (aspergillosis), ガラクトマンナン抗原 (galactomannan antigen), (1→3)- β -D-グルカン ((1→3)- β -D-glucan), 非特異反応 (non-specific reaction)

1. 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る。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^{1, 2)}。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の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診断し、早期治療に結びつける努力が行われてきた。

本稿では、アスペルギルス感染症診断における血清診断法の最近の流れと、(1→3)- β -D-グルカン (β -グルカ

ン) 測定の問題点およびその解決法の開発に至るまでを紹介する。

2. アスペルギルス感染症の血清診断

アスペルギルス感染症には易感染宿主に日和見感染として急激に発症する侵襲性アスペルギルス症 (IA) と、免疫能の保たれた宿主肺の既存空洞内に菌球を形成するアスペルギローマ、これらの中間型と位置づけられる慢性壊死性肺アスペルギルス症 (CNPA) などの病態に分類される。中でも IA は死亡率の極めて高い病態で易感染宿主の予後を大きく左右する。したがって IA の早期診断は臨床上極めて重要な課題であり、わが国の臨床現場では血中ガラクトマンナン抗原の測定が多用されている。

(1) ガラクトマンナン抗原検出法の臨床応用

現時点で IA の診断に最も信頼性の高い検査法は ELISA を応用して血中にガラクトマンナン (GM) 抗原を検出する方法である³⁾。GM はアスペルギルス細胞壁の構成蛋白の 1 つで 35-100 kDa の分子量と推定されている⁴⁾。本法は *Aspergillus fumigatus* の GM のガラクトフランに結合するラットモノクローナル抗体 EB-A2 をプローブとして使用し GM を検出する。従来用いられていたラテックス凝集法を応用した GM 検出法が 15 ng/ml を検出限界としていたのに対し、ELISA 法では 1 ng/ml の GM を血清中に検出可能であり、特異度を大きく損なうことなく感度が飛躍的に向上している。臨床検討でも

ラテックス凝集法に比して2-3週間早期にGMを検出可能との報告がなされているようである⁵⁾。すなわちGM抗原ELISA法はIAの臨床診断に大きく寄与してきたと言えるが、Mennink-Kerstenら⁴⁾は総説の中で、特異度については概ね一定の成績と評価が示されているものの、感度は報告により様々に異なっていることを指摘している。さらに感度にばらつきの生じる原因について、真菌に由来する要因として真菌株、その成長程度、抗原放出量などを、宿主要因として基礎疾患、病巣の部位や拡がり、抗真菌療法の有無、年齢、さらに方法論に由来する要因としてはELISA法の限界、検体採取や検体保存方法、症例の診断区分、測定値評価法(カットオフインデックス: COI)などを問題点として挙げている。

現行のCOIは一般に1.0以下を陰性、1.0-1.5をグレイゾーン、1.5以上を陽性と設定され、一定の感度・特異度が得られるとされているが、特定の領域の易感染宿主にGM抗原ELISA法を応用する際に、独自にCOIを現行の基準より低い数値に設定して運用する試みが行われ、良好な成績が蓄積されてきている。COIを1.0に設定して特異度を大きく損なわずに感度が69%から100%に向上したとする報告⁶⁾や、ROC解析からCOI 0.6を最適値とする報告⁷⁾、また同様に0.5を最適値とする報告⁸⁾などが散見される。ただしこれらの報告は骨髄移植患者を含めた血液悪性疾患を基礎に有するIA発症の極めてハイリスクな宿主を対象とした成績である。したがって、これらのCOIを呼吸器内科領域などの患者にそのまま応用することは、種々の問題をはらんでいると考えられ注意も必要である。

他方、GM抗原検出の妨害因子の報告も少なくない。最近では抗菌薬のtazobactam/piperacillin (TAZ/PIPC)を投与中の患者におけるGM抗原の偽陽性の報告⁹⁻¹¹⁾が相次ぎ、臨床上的問題点として注目された。PIPCの半合成製造過程で用いる*Penicillium* spp. が抗菌薬中に残存し、本剤を投与された患者の血清を汚染してEB-A2との交叉反応を来すことが原因と推測されている。また、*Cryptococcus neoformans*のガラクトキシロマンナン抗原もEB-A2と交叉反応し、偽陽性を生じるとの報告¹²⁾がある。また、*Bifidobacterium* spp. のリボグリカンが交叉反応を示す事¹³⁾も最近明らかにされている。*Bifidobacterium* spp. は腸管の正常細菌叢を形成する細菌の1つであり、成人ではその約6%を占めるに過ぎないが乳児においては75%以上を本菌属が占める¹³⁾とされており、Herbrechtら¹⁴⁾が示した、成人の偽陽性率0.9%に対し小児では44%と圧倒的高頻度に偽陽性が認められる原因と考えられる。さらにGangneuxら¹⁵⁾は牛乳に含まれるGMが傷害のある腸管粘膜から吸収される事により偽陽性の生ずる可能性について論じている。一方、前述のHerbrechtら¹⁴⁾は抗アスペルギルス抗体を保有する宿主においてGM抗原の感度が下がることを示し、またMarrら¹⁶⁾は抗真菌薬の予防的投与が行われた症例でもGM抗原検出の感度が低下することを報告している。

ELISAを用いてGM抗原を血中に検出する手法は現

行のアスペルギルス症血清診断法のうち、最も信頼性が高いと考えられているが、一般診療におけるその運用や検査成績の評価は本法の特徴や様々な妨害因子の存在をふまえた上で、慎重に行う必要がある。

(2) 開発中のアスペルギルス症血清診断法

臨床応用はなされていないものの、研究室レベルで検討が進められているアスペルギルス症血清診断法がいくつかあるので紹介する。

マイトジリン (mitogillin) は*A. fumigatus*によって産生される細胞毒性を有する分子量18 kDaの蛋白である。Weigら¹⁷⁾は大腸菌を用いた遺伝子組換え型マイトリジンに対する特異抗体をELISAで血液中に検出する方法を報告している。アスペルギローマ、侵襲性肺アスペルギルス症、播種性アスペルギルス症における感度/特異度は100%/95%、64%/95%、60%/95%とされ、GM抗原ELISA法と組み合わせることで、特異度はそれぞれ87%に低下するものの、感度は100%、74%、78%に向上することが示されている。また、*A. fumigatus*の細胞壁の構成成分であるガラクトマンノプロテイン (galactomannoprotein: Afmp 1p) が抗原性を有することも知られている。Chanら¹⁸⁾は大腸菌を用いて発現させた遺伝子組み換え型Afmp 1pを使用して、アスペルギローマ、IA、健常者、ペニシリウム症、カンジダ症、クリプトコックス症などの症例でAfmp 1pに対する特異抗体検出 (ELISA) を試みている。その結果、特異度は100%、感度はアスペルギローマで100%、IAでは33.3%であったと報告している。さらに同じ研究グループからAfmp 1p抗原をELISAで直接血中に検出する試み¹⁹⁾も報告されている。この方法も特異度は100%と優れている。感度はアスペルギローマでは0%、IAで53.3%とされている。ただし本法と抗Afmp 1p抗体検出法を組み合わせることで評価した場合、IAの感度が86.7%に向上すると論じており、これらの血清診断法にも期待がかかる。しかし、ここで紹介した3つの方法は*A. fumigatus*によるアスペルギルス症患者のみで評価された成績である。特にAfmp 1p系では抗原、抗体とも*A. niger*、*A. terreus*、*A. flavus*には反応しないことが確認されているので、臨床での応用には限界があると考えられる。

3. (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、複数のキットが相次いで開発された。アルカリ処理-発

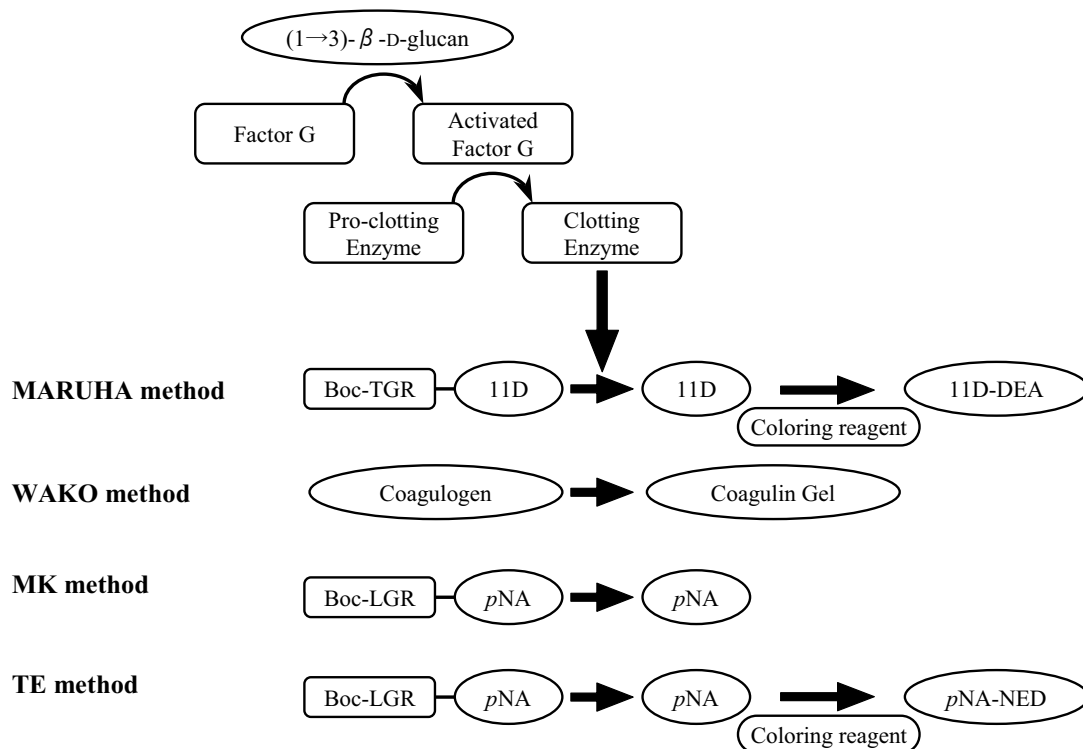


Fig. 1. The *Limulus* cascade reaction followed by the reactions of respective β -glucan measurements. Excluding PCA pretreatment – chromogenic endpoint method.

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の測定キットも同一であるが, 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に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。

これらのことから検体によっては測定キット間で測定値および判定結果に不一致が生じ, 感度・特異度など検査の性能にも少なからず差違のあることが明らかにされてきた。すなわち, 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, 感度が高くとも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投与が開始され問題となる場合がある。

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。ここではこの様な臨床的疑問をきっかけとして開始した β -グルカン測定法の問題点の追究とその改良に至る経緯を紹介する。

(1) 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, アルブミンなどの血液製剤, ガーゼなどの中には β -グルカンを含むものがある。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善で自然界の β -グルカンが混入した場合にも高値を呈する。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進み, β -グルカン値は正しく測定されることとなる。しかし, 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。

一方, 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²⁰⁾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。

(2) 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

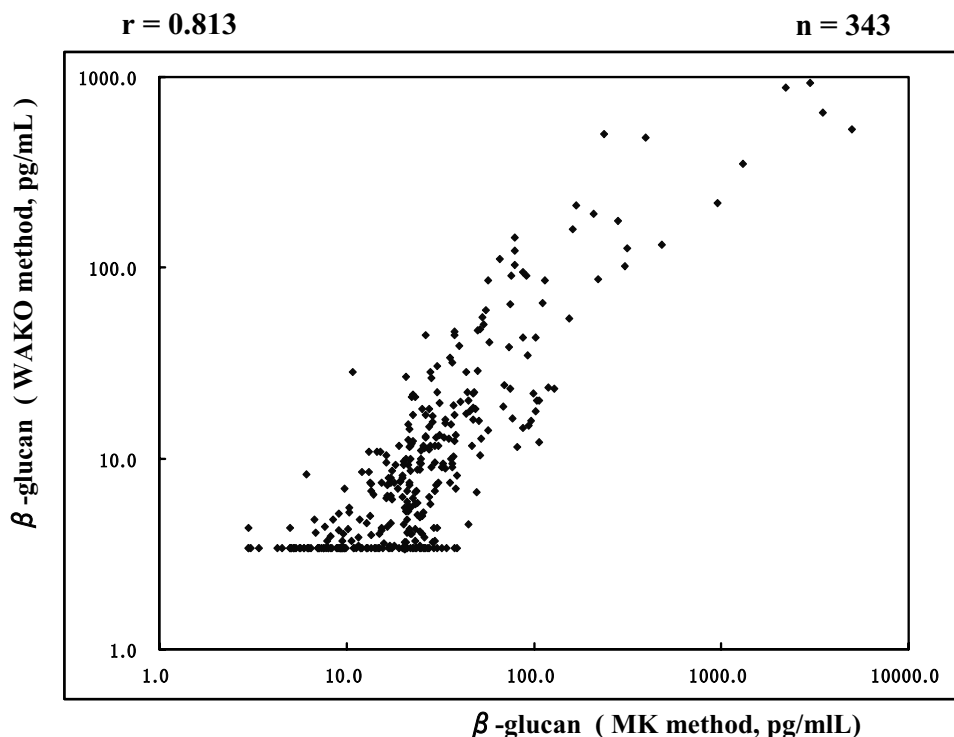


Fig. 2. Comparison between (1→3)- β -D-glucan measured by WAKO and MK assay.

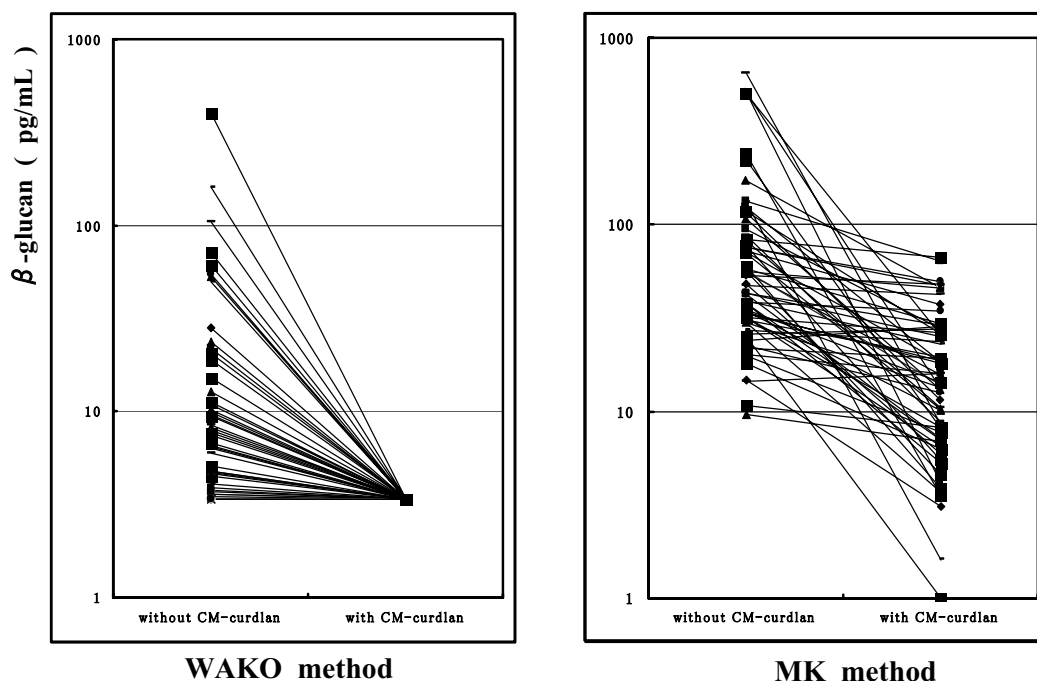


Fig. 3. Comparison between results of β -glucan measured by both methods with or without CM - curdlan.

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 -グルカントテストワコー; 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²¹⁾。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、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²²⁾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 -グルカントテストマルハ; 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) を用いてリムル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。

(3) 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²³⁾。2002

年 8 月から 9 月の期間、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影響を及ぼしていることが判った。

(4) 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

Table 1. Sensitivity, specificity, the positive predictive value and the negative predictive value of 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%

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 samples (200)	0-3.8	61	30.5	184	92.0
	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

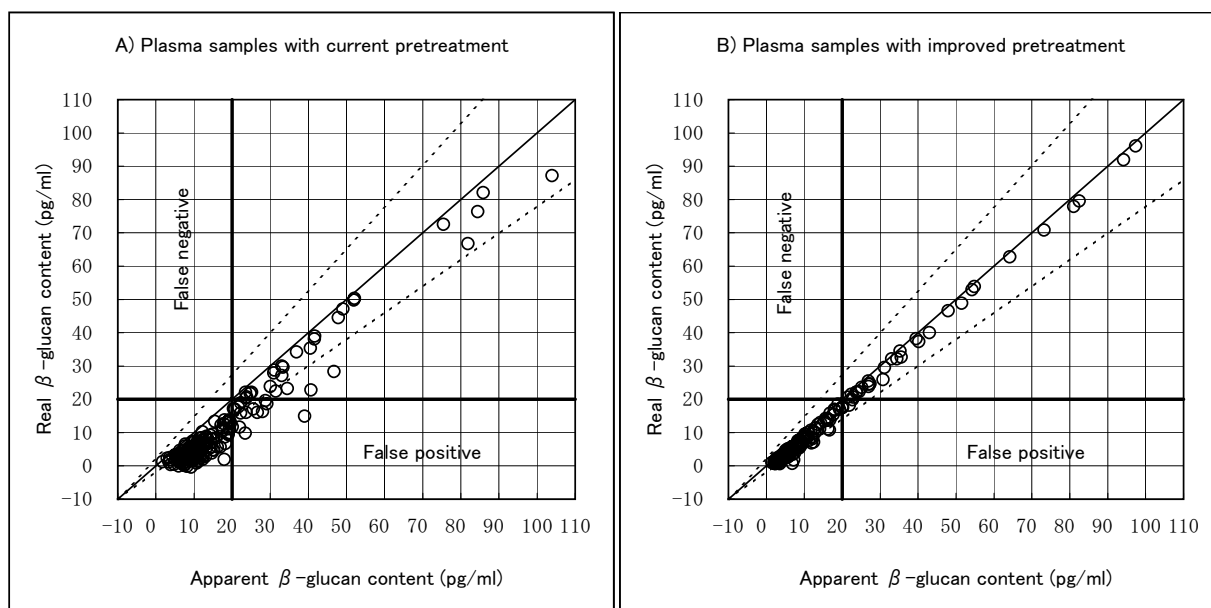


Fig. 4 Comparison of non-specific reactions between the current and improved pretreatment reagents.

Out of 200 plasma samples, 180 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.

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²⁴⁾。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伴う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、不溶化させることが考えられたため、試行錯誤の結果、MK法の従来型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従来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²⁵⁾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 Na_2SO_4 を添加した組成、0.05 M KOH-0.6 M KCl-20 mM EDTA-0.1% Polybrene-50 mM Na_2SO_4 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 Fig. 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た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 -グルカン測定の非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法ではこの新しい改良アルカリ前処理液が使用されている。

4. おわりに

アスペルギルス症の血清診断法と β -グルカン測定の進歩に関して述べた。

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5月、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^{26, 27)}が発表され始めているが、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。

深在性真菌症の血清診断法は改良を繰り返されながら徐々に進歩してきた。しかし未だ単独の検査法で感度・特異度共に十分に満足できるレベルに到達しているとは言えないのが現状であろう。今後はさらに新しい真菌抗原や蛋白の発見と共に、検査に最も適する検体あるいは検体採取時期の検討、また基準値の見直しなど現行法の性能を高めるための検査運用方法の工夫も重要な課題であると思われる。

血清診断法先進国の臨床医として、今後、さらにこれら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) Mora-Duarte J, Betts R, Rotstein C, Colombo AL, Thompson-Moya L, Smietana J, Lupinacci R, Sable C, Kartsonis N, Perfect J: Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis. *N Engl J Med* **347**: 2020-2029, 2002.
- 2) Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF, Bennet JE, Greene RE, Oestmann JW, Kern WV, Marr KA, Ribaud P, Lortholary O, Sylvester R, Rubin RH, Wingard JR, Stark P, Durand C, Caillot D, Thiel E, Chandrasekar PH, Hodges MR, Schlamm HT, Troke PE, DePauw B: Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med* **347**: 408-415, 2002.
- 3) 山口英世: 真菌症とくにカンジダ症とアスペルギルス症の血清診断の進歩. 真菌誌 **43**: 215-231, 2002.
- 4) Mennink-Kersten MASH, Donnelly JP, Verweij PE: Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis* **4**: 349-357, 2004.
- 5) 山口英世: 真菌症の診断法. 病原真菌と真菌症 (山口英世 著), pp.71-102, 南山堂, 東京, 2005.
- 6) Ulusakarya A, Chachaty E, Vantelon JM, Youssef A, Tancréde C, Pico JL, Bourhis JH, Fenaux P, Munc JK: Surveillance of *Aspergillus* galactomannan antigenemia for invasive aspergillosis by enzyme-linked immunosorbent assay in neutropenic patients treated for hematological malignancies. *Hematol J* **1**: 111-116, 2000.
- 7) Kawazu M, Kanda Y, Nannya Y, Aoki K, Kurokawa M, Chiba S, Motokura T, Hirai H, Ogawa S: Prospective comparison of the diagnostic potential of real-time PCR, double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for galactomannan, and (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucan test in weekly screening for invasive aspergillosis in patients with hematological disorders. *J Clin Microbiol* **42**: 2733-2741, 2004.
- 8) Marr KA, Balajee SA, McLaughlin L, Tabouret M, Bentsen C, Walsh TJ: Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis: variables that affect performance. *J Infect Dis* **190**: 641-649, 2004.
- 9) Viscoli C, Machetti M, Cappellano P, Bucci B, Bruzzi P, Lint MTV, Bacigalupo A: False-positive galactomannan Platelia *Aspergillus* test results for patients receiving piperacillin-tazobactam. *Clin Infect Dis* **38**: 913-916, 2004.
- 10) Adam O, Aupérin A, Wilquin F, Bourhis JH, Gachot B, Chachaty E: Treatment with piperacillin-tazobactam and false-positive *Aspergillus* galactomannan antigen test results for patients with hematological malignancies. *Clin Infect Dis* **38**: 917-920, 2004.
- 11) Singh N, Obman A, Husain S, Aspinall S, Mietzner S, Stout JE: Reactivity of Platelia *Aspergillus* galactomannan antigen with piperacillin-tazobactam: clinical implications based on achievable concentration in serum. *Antimicrob Agent Chemother* **48**: 1989-1992, 2004.
- 12) Dalle F, Charles PE, Blanc K, Caillot D, Chavanet P, Dromer F, Bonnin A: *Cryptococcus neoformans* galactoxylomannan contains an epitope(s) that is cross-reactive with *Aspergillus* galactomannan. *J Clin Microbiol* **43**: 2929-2931, 2005.
- 13) Mennink-Kersten MASH, Roegerbrink D, Klont RR, Warris A, Gavini F, Op den Camp HJM, Verweij PE: Bifidobacterial lipoglycan as a new cause for false-positive Platelia *Aspergillus* enzyme-linked immunosorbent assay reactivity. *J Clin Microbiol* **43**: 3925-3931, 2005.
- 14) Herbrecht R, Letscher-Bru V, Oprea C, Lioure B, Waller J, Campos F, Villard O, Lis KL, Natarajan-Amé S, Lutz P, Dufour P, Bergerat JP, Candolfi E: *Aspergillus* galactomannan detection in the diagnosis of invasive aspergillosis in cancer patients. *J Clin Oncol* **20**: 1898-1906, 2005.
- 15) Gangneux JP, Lavarde D, Bretagne S, et al: Transient

- Aspergillus antigenemia*: think of milk. Lancet **359**: 1251, 2002.
- 16) Marr KA, Laverdiere M, Gugel A, Leisenring W: Antifungal therapy decreases sensitivity of the *Aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay. Clin Infect Dis **40**: 1762-1769, 2005.
 - 17) Weig M, Frosch M, Tinteln K, Haas A, Groß U, Linsmeier B, Heesemann J: Use of recombinant mitogillin for improved serodiagnosis of *Aspergillus fumigatus*-associated diseases. J Clin Microbiol **39**: 1721-1730, 2001.
 - 18) Chan C, Woo PCY, Leung ASP, Lau SKP, Che X, Cao L, Yuen K: Detection of antibodies specific to an antigenic cell wall galactomannoprotein for serodiagnosis of *Aspergillus fumigatus* aspergillosis. J Clin Microbiol **40**: 2041-2045, 2002.
 - 19) Woo PCY, Chan C, Leung ASP, Lau SKP, Che X, Wong SSY, Cao L, Yuen K: Detection of cell wall galactomannoprotein Afmp1p in culture supernatants of *Aspergillus fumigatus* and in sera of aspergillosis patients. J Clin Microbiol **40**: 4382-4387, 2002.
 - 20) 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.
 - 21) 吉田耕一郎, 二木芳人, 見手倉久治, 中島正光, 川根博司, 松島敏春: 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**: 237-242, 2001.
 - 23) 吉田耕一郎, 二木芳人, 宮下修行, 松島敏春: 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.
 - 24) 吉田耕一郎, 二木芳人, 毛利圭二, 宮下修行, 小橋吉博, 松島敏春: 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.
 - 25) 吉田耕一郎, 二木芳人, 毛利圭二, 森祐一朗, 尾長谷靖, 福田 実, 宮下修行, 小橋吉博, 岡 三喜男: 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.
 - 26) 吉田耕一郎, 二木芳人, 松田淳一, 平瀧洋一, 小田俊男, 明田川純, 大林民典, 河野 茂, 岡 三喜男: 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.
 - 27) Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, Kantarjian H, Saeki F, Ridge RJ, Ketchum PA, Finkelman MA, Rex JH, Ostrosky-Zeichner L: 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.
 - 28) Pazos C, Ponton J, Paracio AD: 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 Microbiol **43**: 299-305, 2005.

Recent Advances of Serodiagnosis for Systemic Fungal Infections

Koichiro Yoshida

Division of Respiratory Diseases, Department of Medicine, Kawasaki Medical School
577 Matsushima, Kurashiki, Okayama 701-0192, Japan

Serological surrogate tests for invasive fungal infection have been used practically in Japan. The *Aspergillus* galactomannan antigen detection kit by enzyme linked immunosorbent assay is the most reliable test for making a diagnosis of invasive aspergillosis. But in recent years, occurrences of false positive and negative results have also been reported by several investigators. Therefore, evaluation of the results of this assay should be done carefully in the clinical stage. Moreover, some other methods to detect the *Aspergillus* antigen or anti *Aspergillus* antibody in serum have also been reported.

The problem of false positive results due to the frequent occurrence of non-specific reaction in the alkaline treatment, chromogenic automated kinetic assay to measure (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucan had been noticed in Japan. But this important problem was resolved by improvement of the pretreatment reagent in this kit in July 2005. In this manuscript, I describe recent trends of serological surrogate tests for *Aspergillus* infection and the process of improvement of the (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucan measurement kit.