

造血器悪性腫瘍患者における  
アスペルギルス感染症の検討

上 島 底

造血器悪性腫瘍患者における  
アスペルギルス感染症の検討

東京大学医学系研究科  
内科学専攻  
上 昌広

## 目次

序言	2
方法	6
結果	18
考察	34
結語	44
引用	45
謝辭	49

## 序言

大量化学療法が発達により造血器悪性腫瘍の予後は改善した。しかし、大量抗癌剤投与・長期間の免疫抑制剤使用により、高度免疫抑制状態が人工的に誘導されるようになり、日和見感染症の頻度が増加している。感染症対策の変化とともに起炎菌も変化しており、臨床家はこの変化に対応し診断・治療戦略を変更する必要がある。

細菌感染症は耐性菌の問題が存在するものの(1,2)、新規抗生剤の開発・感染予防の向上・*empiric therapy*の普及により好中球低下患者の管理は向上したと思われる。特に細菌感染予防にニューキノロン系抗生物質が投与されるようになり、好中球減少時の敗血症性ショックの頻度は激減した(3)。また、ガイドライン作製による啓蒙活動も治療成績向上に関与している。1993年にPizzo等がNew England Journal of Medicine誌に好中球減少時の感染症対策のガイドラインを発表し(4)、その後、アメリカ感染症学会も独自のガイドラインを作製し定期的に改訂している。最近では1997年に改訂が行われ、Clinical Infectious Disease誌に発表された(5)。この論文ではバンコマイシンの適正使用についての検討などが盛り込まれ、時代情勢を反映したものとなっている。

造血器悪性腫瘍症例の感染症対策も多くの進歩が認められる。前述の敗血症性ショックの減少以外に、骨髄移植後のサイトメガロウイルス感染症のリスクは著明な低下を認める(6)。これはガンシクロビルの開発(6)、サイトメガロ抗原血症による早期診断(7)、PCR法の応用などが原因と考えられている。私もサイトメガロウイルス感染症の早期診断目的に定量PCR法の系を確立し臨床応用している(8)。

近年、造血器悪性腫瘍症例で問題視されるようになったのは、真菌感染症である。特に内臓臓器へ播種する深在性真菌感染症が好中球低下症例では多発する。Meyers等は、白血病剖検症例の30%程度に播種性深在性真菌症を認め、白血病の化学療法後、或いは骨髄移植症例の50%が真菌感染症に罹患すると報告している(9)。これは腎臓・心臓移植では真菌感染症の頻度は10-20%程度である事とは対照的である。

真菌感染症の原因菌もこの10年間で大きく変化した。1986年に英国ファイザー社で開発されたトリアゾール系抗真菌剤である

fluconazole (Diflucan<sup>TM</sup>, Pfizer)が臨床応用されるようになり、かつての真菌感染症の主役であった*Candida albicans*の頻度は激減した(9)。かわって問題視されるようになったのは、*Candida glabrata*, *Candida krusei*などの非アルビカンス系カンジダ属とアスペルギルス属である(10)。前者はfluconazoleに対し中程度の感受性を有するため、大量のfluconazole、或いはamphotericin B (AMPH-B)(Fungizone<sup>TM</sup>, Bristol Meyers Squive)を投与すれば治療可能である。しかし、代表的糸状真菌であるアスペルギルスはFCZ・AMPH-Bへの感受性は低く、予後不良である。当科でも造血器悪性腫瘍症例におけるアスペルギルス症の発症頻度は無視しがたいものがある。しかし、アスペルギルス症の病態・早期診断方法・治療法は確立されているとはいえない。前述のアメリカ感染症学会のガイドラインでもアスペルギルス感染症の記載は数行で(5)、臨床的重要性とこれに対する注目には大きな解離が存在する。現時点では早期診断に基づく、早期治療が最も有効な対応策である。このような観点から、私は造血器悪性症例におけるアスペルギルス感染症の研究を開始した。

まず、早期診断方法を検討した。IPAの確定診断は組織診断によりなされるが、予後改善には、早期診断・早期治療が必須である(11)。好中球減少患者では侵襲的検査は困難であり、何らかの非侵襲的診断方法を開発する必要がある。現在、非侵襲的検査方法としては画像検査と血液検査が存在する。前者の代表は胸部CTであり、すでにKuhlman等が診断基準を確立している(12)。後者にはアスペルギルスの細胞壁を構成するガラクトマンナン抗原をエпитープとした抗原検査法と、同じく真菌の細胞壁構成成分である(1→3)- $\beta$ -D-glucan (BDG)を検出する方法が存在する。ガラクトマンナン抗原の検出にはラテックス凝集反応とenzyme-linked immunosorbent assay (EIA)を利用した方法が開発されている。現在、日本ではラテックス凝集反応キットが販売され広く臨床応用されている(Pastorex Aspergillus<sup>TM</sup>, Sanofi, Diagnostic Pastuer, France)。BDGの検出は、自治医大のグループがhorseshoe crabのG-factorを用いた測定系を開発し(13)、臨床応用されている(Fungi-Tec<sup>TM</sup>, Seikagaku Corporation, Tokyo, Japan)。何れも感度は50-90%、特異度は90%以上と報告されている(14-16)。もちろんBDGは*P. carinii*も含めた真菌一般に反応するため、アスペルギルス属に特異的というわけではない。しかし、BDGが陽性化した場合に

は何らかの真菌感染の存在を示唆するもので、画像診断とあわせて判断すればIPAの有力な補助診断となりうるものである。IPAの治療においては、抗原検査は感度・特異度の問題とともに、いかに早期に陽性化し治療方針決定に関与するかが重要である。胸部CT検査がIPAの比較的早期に病変を検出し治療方針決定に有用であるとの報告が、1997年にCalliot等によりなされた(11)。しかし、抗原検査のこのようなデータはなく、勿論、血液検査と画像検査を比較した研究はない。この為、我々はprospectiveに両者を評価した。

この際にIPAと診断されない患者でも、時にアスペルギルス抗原検査が陽性を示し、これが好中球減少時に集中していることに気づいた。IPAはそもそも好中球低下時に発症する疾患であり、この時期に擬陽性を呈することは、本検査の陽性的中率を損ねる可能性がある。このアスペルギルス抗原検査の信頼性の根幹に関わる問題を、保存血清を用いて検討した。

次に行ったのはIPAの遺伝子診断方法の確立である。PCR法は培養・抗原検査と比較して高感度であるため、早期に病変を検出できる可能性がある。一方、胸部CTはIPA早期診断に有効であるが、無菌室管理の症例には行いにくく、また被曝・手間などの問題を有する。もし、血液検体を用いたアスペルギルス特異的PCR法を確立すれば、簡便性ゆえにIPAの早期診断に貢献する可能性がある。しかし、これまで肺胞洗浄液を用いたPCR法は確立しているものの、血液・血清を用いたPCR法は成績が安定せず(17, 18)、その有効性は不明である。我々は血液サンプルよりのDNA抽出段階に問題があると考え、抽出法の検討を行い、定性・定量PCR法の確立を試みた。

次に行ったのは、中枢神経アスペルギルス症の特異的診断方法の確立である。浸潤性アスペルギルス症の好発臓器は肺であるが、鼻腔、中枢神経、腸管、腎臓、肝臓、甲状腺への浸潤も報告されている(19)。中枢神経アスペルギルス症は比較的稀な疾患であるが、近年その頻度は増加している(20)。通常、脳梗塞、脳膿瘍を生じ、髄膜炎として発症することは少ないとされている(21)。近年、アスペルギルス症の診断技術は向上しているが、中枢神経アスペルギルス症はいまだ診断が困難な疾患である。培養検査は陽性となることがほとんどなく、また髄液一般検査所見は非特異的である。おもに画像検査と臨床経過より診断がなされてきたが、発症早期には画像検査

では病変を検出できないことが報告されている(22)。治療成績向上のためには早期診断が必須であるが、診断の為には開頭生検・経皮的針生検が必要と考えられている。私は1996年、拡散強調画像(23)と髄液のアスペルギルス特異的PCR法を用い、非侵襲的に中枢神経アスペルギルス症を診断した(24)。これまで、PCR法の中枢神経アスペルギルス症診断への応用はなされておらず、非侵襲的診断法として有望であると考え、その評価を行うこととした。

アスペルギルス感染症は早期診断・早期治療とともに、その予防が重要である。予防法の確立には感染経路の解明が必須であるが、これについては未解明の部分も大きい。従来よりIPAの主要感染経路は気道であると考えられてきたが、当科のsurveillance cultureでは鼻腔のアスペルギルスのコロニー形成を認めることはほとんどなく、また鼻腔アスペルギルス症の発症もない。この為、従来の経気道感染のみでアスペルギルス感染症をすべて説明できるとは考えにくい。近年、アスペルギルスなど糸状菌は水分がなければ生存することができず、病棟内ではシャワー・恒温槽などにコロニーを形成し、水を利用したときにaerolizationを生じ飛沫感染することが報告された(25)。我々は患者の周囲に存在するアスペルギルスコロニー形成場所として、カテーテルの存在に注目した。中心静脈カテーテルは長期間留置され、また豊富な栄養分・抗生物質を投与されるために、アスペルギルスの生息場所として有利な条件を提供している。また、日常用いるアルコール綿での消毒ではアスペルギルスを殺菌することはできない。以上の理由より、経気道感染すると考えられてきたアスペルギルス症が、カテーテルを介した院内感染を起こすという仮説をたて、患者サンプルを用いて検討した。

## 【方法】

### 1) IPA早期診断における胸部CTと抗原検査の比較検討

#### 対象

1997年1月から1998年5月までに旧第3内科に入院し、化学療法を施行した造血器悪性腫瘍症例を120症例。

#### 抗腫瘍療法

26症例は造血幹細胞移植を受けた。主として骨髄球性悪性腫瘍症例にはBU/CY、リンパ球性白血病症例にはCY/TBIにて前処置を行った。graft-versus-host disease予防にはshort-term methotrexate + cyclosporineにて行った。

94症例は化学療法を行った。急性骨髄球系白血病患者はcytarabine, anthracycline、急性リンパ球系白血病患者・リンパ芽球性リンパ腫患者はsteroid, vincristine, cyclophosphamide, L-asparaginaseによる寛解導入療法のあと、cytarabine 大量療法, anthracyclineによる地固め療法をうけた。再発例にはcytarabine 大量療法, anthracyclineによる再寛解導入を行った。

悪性リンパ腫初発症例は、CHOP療法6コースを行った。再発例にはECAM療法を行った。

骨髄異形成症候群の治療は症例に応じて行った。

慢性骨髄球性白血病症例はすべてが同種骨髄移植を行った。

慢性リンパ性白血病は再発例のみ、大量抗ガン剤投与を行うこととした。治療方法は症例ごとに検討した。

#### 感染症対策

細菌感染予防はtosufloxacin tosilate (TFLX)(Ozex<sup>TM</sup>, 富山化学工業) 200 mg/日 経口投与、真菌感染予防はFCZ 200mg ないし400mg経口投与、カリニ肺炎予防はST合剤(Baktar<sup>TM</sup>, 塩野義) 4g/日を週に3回経口投与した。

腋下温を1日3回測定し、38度以上の発熱、或いは臨床的に感染症を疑った場合には、第3世代セフェムとアミノグリコシド系抗生物質を経静脈的に投与した。起炎菌が確定すれば、もっとも感受性のある抗生物質に変更した。5-7日間以上発熱が継続する場合には

FCZ投与を中止し、AMPH-Bの経静脈的投与を開始した。深在性アスペルギルス症・ムコール感染症を疑った、あるいは診断した場合は、AMPHは1.5mg/kgまで増量した。それ以外の不明熱、あるいは真菌感染症の場合はAMPHは0.5mg/kgの投与を続けた。有熱期間中は週に最低1回以上、胸部X線写真を撮影し、AMPH-B開始時には可能な限り胸部CTを撮影した。また発熱が続く場合には、腹部エコーを行った。

末梢血好中球数が500/ $\mu$ l以下に低下した状態を、好中球低下状態と定義し、好中球低下期間は、咽頭・便・尿のSurveillance cultureを実施した。鼻腔のアスペルギルスのcolonizationを評価するため、化学療法開始前に1回鼻腔ぬぐい液の培養を行った。

## 診断基準

### IPA

剖検、或いは生検にて肺に糸状菌の浸潤が組織学的に証明され、病変部・喀痰・気管支洗浄液の培養にてアスペルギルス属を検出したもの、あるいは肺病変に加えて、無菌部位の培養にてアスペルギルス属を確認したものを確診例と定義。

抗生剤不応性の発熱に加え、胸部CTにてhalo sign、或いはair-crescent signを呈した症例を疑い例と定義した(図1)。

halo sign は肺の出血性梗塞によるものと考えられ、IPA早期に出現する。air-crescent signは、好中球回復後の治癒病巣での組織壊死によるものと考えられている。ともに粟粒結核・サイトメガロ肺炎・癌転移・ムコール感染症などでも認められることが報告されているが(26)、造血器悪性腫瘍症例、特に白血病患者ではIPAに特異的であると考えられている(12)。

深在性カンジダ感染症 剖検、或いは生検にて深在性カンジダ症と診断されたもの、あるいは無菌部位よりの培養にてカンジダを確認したものを確診例と定義。抗生剤不応性の発熱に加え、腹部画像検査(エコー、CT)にて肝臓・脾臓に多発性腫瘤陰影をみとめたものを深在性カンジダ症疑いと定義した。

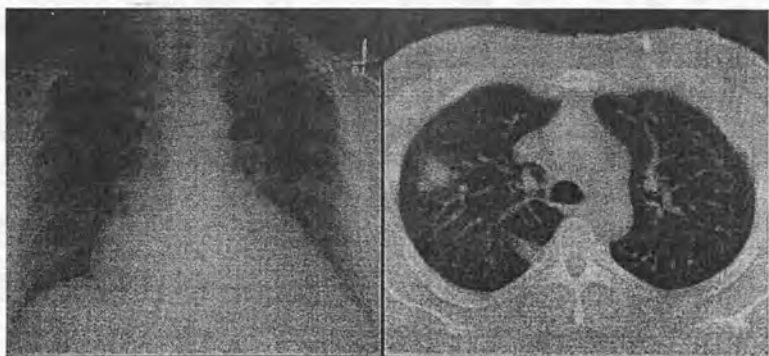
他の真菌症 剖検、或いは生検にて深在性真菌感染症を確認されたものを確診例と定義。無菌部位よりの培養で検出されたものも確診例とした。カンジダ、アスペルギルス以外は疑いの基準は確立しておらず、今回の研究には用いなかった。

図 1 ; 胸部CT・X線における halo sign と air-crescent sign

A) air-crescent sign



B) halo sign



## サンプル

化学療法開始より退院、または死亡まで毎週血液サンプルを採取し、血算、ラテックス凝集反応(LA)(Pastorex Aspergillus™, Sanofi, Diagnostic Pasteur, France)、血漿(1→3)- $\beta$ -D-glucan定量(BDG定量)(Fungi-Tec™, Seikagaku Corporation, Tokyo, Japan)を行った。BDG定量のカットオフ値は20 pg/mlとした(15)。LAは希釈しない血清を用い、凝集の有無を目算で判断した。LA, BDG定量陽性サンプルについては、2回検査を行い、両方とも陽性の場合を陽性とみなした。

IPAと診断されなかった症例より採取したサンプルと、IPAと診断された症例より採取されたサンプルで最初の発熱以前、或いはIPAの改善を認めた以降に採取したサンプルはnon-IPAサンプルと定義した。IPAの改善とは、解熱と胸部CTの正常化を共に満たす事が必要とした。ただし、胸部CTは、瘢痕を残しても活動性の病変を有さない場合は正常と判断した。

IPAと診断された症例で、最初の発熱以降、IPAの改善までに採取した検体をIPAサンプルと定義した。

## 単純X線写真、CT撮影、読影基準

抗生剤不応性の発熱、或いは呼吸器感染症を示唆する所見を認めた場合、速やかに胸部CTを撮影した。また、有熱期間中は最低週に1回胸部X線写真を撮影した。胸部CTは1.0 cmのcollimationで1.0 cmのintervalを用いた。全肺野に渡り1.0 cm厚で撮影し、病変を疑うときは2 mm厚で撮影した。造影剤は使用しなかった。CT 画像は肺野はW, 1200 HU, C, 800 HUで、縦隔はW, 500 HU, C 0 HUで処理した。

撮影された胸部X線写真、CT写真は患者の病歴をしらない放射線科医師(増本智彦氏)が判読した。

## 2) 非IPA症例に生じるラテックス抗原検査陽性の解析

### 「非IPA症例におけるLA陽性サンプル」の定義

IPAと診断されなかった症例より採取した検体がLA法陽性となった場合、「非IPA症例におけるLA陽性サンプル」と定義した。これは、患者はIPAに罹患していたが診断できなかった場合、検査の誤り(汚染、交差反応などの擬陽性)等により生じると考えられる。

### 「一過性アスペルギルス抗原血症サンプル」の定義

以下を満たす検体を「一過性アスペルギルス抗原血症」と定義した。すべての「一過性アスペルギルス抗原血症サンプル」は「非IPA症例におけるLA陽性サンプル」に含まれる。

- 1) 無熱でIPAを示唆する臨床症状を有さない症例より採取した検体がLA法で陽性となる事。
- 2) 検体を採取した症例が、胸部CTにてIPA病変を認めない事。
- 3) 検体を採取した症例が、その後IPAを発症しなかった事。
- 4) 陽性サンプルの出現は一過性であること。つまり、その後の検査で陰性を確認していること。

この基準を満たした場合、擬陽性の可能性は否定できないが、臨床的にIPAに罹患していた可能性は低く、患者はIPAに罹患していたが診断できなかった可能性は低いと考えられる。

### 一過性アスペルギルス抗原血症の原因の検討

一過性アスペルギルス抗原血症の原因として、ラッテクスの非特異的凝集反応、ガラクトマンナン抗原と他の物質の交叉反応の影響を検討するため、一過性アスペルギルス抗原血症と診断されたサンプルで保存検体が存在するものについては、EIA法(Platelia Aspergillus<sup>TM</sup>, Sanofi, Diagnostic Pasteur, France)とアスペルギルス特異的PCR法にてアスペルギルス菌体の存在を確認した。

周囲よりのcontaminationの影響を検討するため、健常人より採取した血清を皮膚・頭髮・研究室のほこり・病室のほこり・病院周囲の土壌で意図的に汚染し、このサンプルのガラクトマンナン抗原の有無をLA法にて検討した。皮膚・頭髮については18ゲージ注射針で健常人の皮膚・頭皮を数回こすった後、健常人より採取した血清と混合しvortexした。研究室と病室のほこりについては、同じく18ゲージ注射針にて北病棟5階採血処理室、大部屋病棟の床(各部屋の角の部分)を数回こすった後、健常人より採取した血清と混合しvortexした。土壌については、病棟周囲の土壌は0.5 gを健常人より採取した血清に追加しvortexした。

ガラクトマンナン抗原と投与薬剤の交叉反応を検討するため、健常人より採取した血清を過剰量の薬剤と混合して、このサンプルをLA法にて検討した。混合した薬剤はAMPH-B (0.005 mg/ml), FCZ

(0.05mg/mg), ceftadidime (0.01 mg/ml), imipenam/cilastin (0.01 mg/ml), amikacin (0.1 mg/ml), tobramycin (0.1 mg/ml), cytarabine (0.01 mg/ml), epiphodoxin (0.01 mg/ml), adriamycin (0.01 mg/ml), daunorubicin (0.01 mg/ml), vincristine (0.01 mg/ml), famotidine (0.01 mg/ml)である。

同様に10  $\mu$ lのアスペルギルス培養液を健常人血清990  $\mu$ lに希釈したサンプルに前述の薬剤を追加し、LA法による検出を阻害するか検討した。

統計的手法 統計量の処理はFisherの直接法、またはカイ2乗検定を用いて両側検定を行った。p値が5%以下の場合統計的に有意とみなした。

### 3) 遺伝子診断法の確立

#### 1) DNA抽出法の検討

以下の方法でDNAを抽出し、下記の手順でPCR反応を行った。まず、サブロー培地上のアスペルギルスコロニーをマイクロチップでピックアップし、TE 100  $\mu$ lに入れボルテックスした。この溶液10  $\mu$ lをとりアスペルギルスを含まないTE 90  $\mu$ lで希釈して10倍の希釈サンプルを作った。この要領で10倍ずつの希釈系列を $10^{-6}$ まで作製した。この希釈サンプルより、方法1から方法3でDNAを抽出し、下記のオリゴヌクレオチドプライマー・反応条件を用いて増幅した。ただし、nested PCRは行わず、outer primerを用いた反応のみで判定した。

#### 方法1：簡便抽出法

1) 血清100  $\mu$ lを100  $\mu$ lのLysis Buffer (100 mM KCL, 20 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mg/ml gelatin, 0.9% Tween20)と1  $\mu$ lのproteinase K (1mg/ml)をくわえボルテックス。

2) 55℃ 60分

3) 95℃ 10分

4) 15000 rpm, 10分, 4℃

5) 上清をとる

6) フェノール・クロロホルム処理

- 7) クロロホルム抽出
- 8) エタノール沈殿
- 9) 乾燥
- 10) 10  $\mu$ l の Tris-EDTA (pH 8.0) に溶解

## 方法 2 酵素法

- 1) 100  $\mu$ l の血清に当量の cell lysis buffer (1% Tween D, 1% TritonX-100, 1% NP-40, 0.05M Tris (pH 7.5)) を追加。
- 2) ボルテックス 2 分間
- 3) 12000 rpm, 2 分間, 4  $^{\circ}$ C
- 4) 沈殿を 1/2 の濃度の cell lysis buffer に溶解
- 5) ボルテックス 2 分間
- 6) pellet を 100  $\mu$ l の Tris-MGCl<sub>2</sub> 溶液 (0.01M MgCl<sub>2</sub>, 0.05M Tris (pH 7.5)) に溶解
- 7) ボルテックス 2 分間
- 8) 12000 rpm, 2 分間, 4  $^{\circ}$ C
- 9) ペレットをとり、6) ~ 8) を繰り返す。
- 10) ペレットを 100  $\mu$ l の Tris-MGCl<sub>2</sub> 溶液に溶解
- 11) 1  $\mu$ l の DNase (1 mg/ml) を追加
- 12) 37 $^{\circ}$ C 15 分間
- 13) 2  $\mu$ l の 0.5M EDTA (pH 8.0) を追加
- 14) 85 $^{\circ}$ C、30 分間
- 15) 12000 rpm, 2 分間, 4 $^{\circ}$ C
- 16) 沈殿を 100  $\mu$ l の fungal lysis solution (0.3 mg/ml Zymolyase, 0.028M 2-ME, 0.01M EDTA, 0.05M Tris (pH 7.5)) に溶解
- 17) 37 $^{\circ}$ C 30 分間
- 18) 1  $\mu$ l の proteinase K (2 mg/ml) を追加
- 19) 1  $\mu$ l の 10% SDS を追加
- 20) 37 $^{\circ}$ C 5 分間
- 21) 100 $^{\circ}$ C 10 分間
- 22) 氷上 1 分間
- 23) フェノール・クロロホルム処理
- 24) クロロホルム抽出
- 25) エタノール沈殿

26) 乾燥

27) 10  $\mu$ l の Tris-EDTA (pH 8.0) に溶解

### 方法3 ガラスビーズ法

1) 血清 100  $\mu$ l に DNA extraction buffer (10 mM Tris-EDTA (pH 8.0), 10 mM EDTA, 0.15M NaCl, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS) 200  $\mu$ l, 0.5 mg Proteinase K per ml (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA)) を追加

2) 200  $\mu$ l の フェノール と 25, 或いは 250 mg の ガラスビーズ を追加

3) それぞれを 2, 5, 10, 20 分間 ボルテックス

4) 15000 rpm, 5 分間遠, 4 $^{\circ}$ C

5) 上清をとる

6) フェノール、クロロホルム処理

7) クロロホルム抽出 2 回

8) 15000 rpm, 5 分間

9) 上清をとる。

10) エタノール沈殿

11) -80 $^{\circ}$ C, 10 分間

12) 15000 rpm, 10 分間, 4 $^{\circ}$ C

13) pellet を 10  $\mu$ l の TE に溶解

### 2) primer の検討

過去に報告されている以下の primer を用い、primer による増幅効率の差異を検討した。アスペルギルスのコロニーをピックアップしたあと、ガラスビーズ法(ガラスビーズ 250 mg で 20 分間 vortex)で DNA を抽出した。その DNA 溶液の 10 倍ずつの希釈系列を作製し、これを用いて PCR 反応を行った。PCR の条件は 3) に示す通り。

2-1) mitochondria DNA fragment sequence(27)

forward primer; 5' GAAAGGTCAGGTGTTTCGAGTC 3'

reverse primer; 5' CTTTGTTGCGGGTTTAGGGA TT 3'

2-2) 18S rRNA gene (18)

forward primer; 5' ATTGGAGGGCAAGTCTGGTG 3'

reverse primer; 5' CCGATCCCTAGTCGGCATAG 3'

2-3) 18S rRNA gene (17)

forward primer; 5' GATAACGAACGAGACCTCGG 3'

reverse primer; 5' TGCCAACCTCCCTGAGCCAG 3'

2-4) 2-3) の PCR 産物を更に nested PCR で増幅(17)

Inner primerとして以下のprimerを利用した。

forward primer; 5' CGCCCCTTAAATAGCCCGGTC 3'

reverse primer; 5' CCTGAGCCAGTCCGAAGGCC 3'

### 3) Primerの特異度の検討

2)で選択されたprimerについては以下の真菌との交差反応を検討した。1) *A. fumigatus*, 2) *A. flavus*, 3) *A. niger*, 4) *Candida albicans*, 5) *Candida glabrata*, 6) *Candida parapsilosis*, 7) *Candida tropicalis*, 8) *Cryptococcus neoformans* 9) *Trichosporon beigelii*

### 4) PCRの条件

PCR反応の反応液組成は50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Triton-X, 250 uM dNTP(dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 1UのTaq DNA polymeraseより構成した。各PCR反応では50 pmolのプライマーと2  $\mu$ lの真菌DNA溶液をtotal volume 50  $\mu$ lの系で行った。増幅反応は35サイクルより構成され、各サイクルは95°C denature 1分間、56°C annealing 1分間、72°C DNA extension 1分間であった。ただし、最終サイクルの進展反応は10分間行った。nested PCR では 1.0  $\mu$ lの第1回PCR産物をTEにて100倍希釈し、この希釈産物1.0  $\mu$ lに新たな反応液と50 pmolのinner primerを加えて第1回目と同様に30サイクル行った。ただし、nested PCRではannealingは65°Cとした。PCR産物のcontaminationの影響を避けるため、各ステップ毎にnegative controlをおいた。PCR産物はethidium bromideを含む2% agarose gelにて電気泳動を行い、写真撮影をした。

### 5) アスペルギルス抗原検査との感度の比較

サブロー培地上のアスペルギルスコロニーを、マイクロチップでピックアップし健常人血清1000  $\mu$ lに溶解した。このうち100  $\mu$ lを分離し、アスペルギルスコロニーを含まない血清 900  $\mu$ lと混合し10倍希釈した。同様の手順を繰り返し10<sup>9</sup>までの希釈系列を作製した。

各希釈系列サンプル500  $\mu$ lを用いて、アスペルギルス抗原検査(EIA, LA法)を行った。

残りの残りの500  $\mu$ lずつの希釈サンプルより方法3(ガラスビーズ250 mgで20分間vortex)を用いて真菌DNAの抽出を行った。希釈血清サンプルより真菌DNAを抽出する際には、抽出効率が低下するこ

とが予想される。これを検討するため、原液より抽出したDNA溶液をTEを用いて希釈し、 $10^3$ までの希釈系列を作製した。この希釈した血清より抽出したDNAと、DNA溶液自体の希釈系列 10サンプルずつを用いてPCR反応を行った。

#### 4) 中枢神経アスペルギルス症の診断方法

**対象** 当院、東京都立駒込病院、国立国際医療センター入院中の患者で、中枢神経アスペルギルス症確診、又は疑いとされた5症例。negative controlとして白血病中枢浸潤を病理的に確認した5症例、ウイルス性髄膜炎を培養にて確認されている1症例を検査した。

**診断基準** 剖検にて中枢神経にアスペルギルス浸潤を認めた症例を確診例とした。また、IPAの診断基準を満たした症例が、中枢神経症状を呈し、頭部画像検査(頭部CT、或いはMRI)にて出血性梗塞、膿瘍を示唆する所見を認めたものを疑い例と定義した。

**サンプル** 神経症状出現後に速やかに髄液検体を採取した。患者の状態が不良の為、髄液検査が行うことができなかった症例については、剖検時に採取した。剖検が行えなかった症例については、死亡後に遺族の同意を得て腰椎穿刺を行い死亡時の髄液を採取した。

**培養検査** 採取した検体は当院細菌検査部にてサブロー培地にて真菌培養を行った。

**抗原検査** 髄液検体は採取後速やかにEIA法 (Platelia Aspergillus™, Sanofi, Diagnostic Pasteur, France), LA法(Pastorex Aspergillus™, Sanofi, Diagnostic Pasteur, France)にてアスペルギルス抗原の有無を検討した。

#### 真菌DNA抽出・PCR反応

上述のガラスビーズ法(ガラスビーズ250 mg, 20分間vortex)を用いてDNAを抽出した。

#### オリゴヌクレオチドプライマーとPCR反応

アスペルギルス属にて保存されている18S rRNA遺伝子配列を利

用し、nested PCRを行った。outer primerは5' GATAACGAACGAGACCTCGG 3' と 5'TGCCAACTCCCCCTGAGCCAG3'を用い、384 bpの産物となった。inner primerは5'CGCCCCTTAAATAGCCCGGTC3' と 5'CCTGAGCCAGTCCGAAGGCC 3'を用い、産物は357bpとなった。

PCR反応の反応液組成は50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Triton-X, 250  $\mu$ M dNTP(dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 1UのTaq DNA polymeraseより構成した。各PCR反応では50 pmolのプライマーと2  $\mu$ lの真菌DNA溶液をtotal volume 50  $\mu$ lの系で行った。増幅反応は35サイクルより構成され、各サイクルは95℃ denature 1分間、56℃ annealing 1分間、72℃ DNA extension 1分間であった。ただし、最終サイクルの進展反応は10分間行った。nested PCRでは1.0  $\mu$ lの第1回PCR産物をTEにて100倍希釈し、この希釈産物1.0  $\mu$ lに新たな反応液と50 pmolのinner primerを加えて第1回目と同様に30サイクル行った。ただし、nested PCRではannealingは65℃とした。PCR産物のcontaminationの影響を避けるため、各ステップ毎にnegative controlをおいた。PCR産物はethidium bromideを含む2% agarose gelにて電気泳動を行い、写真撮影した。

#### 血液の混入の検討

髄液採取の際にtraumatic tapとなり、髄液にアスペルギルス抗原陽性の血液が混入した場合、その混入した血液が髄液抗原検査・PCR反応の結果に影響する可能性がある。

末梢血混入の影響を検討するため、症例1、2、5より採取した末梢血をそれぞれ100倍、1000倍 蒸留水にて希釈して、その希釈サンプルをLA法、EIA法、PCR法にてアスペルギルス真菌成分の存在を検討した。

患者より髄液を採取する際、通常5ml以上を採取するようにしているため、100倍の場合50  $\mu$ l、1000倍の場合5  $\mu$ lの血液を吸入したことと同じである。今回の臨床検体の検討では肉眼的にキサントコロミーを呈したサンプルはなく、末梢血が混入したことを示唆するデータはない。

## 5) 感染経路の解明

**対象** 1998年5月より6月までに旧第3内科に入院した造血器悪性腫瘍症例で、無熱で感染兆候を認めない18症例。いずれも血液学的には完全寛解を維持しており、真菌感染予防としてFCZ 200mg/dayの予防投与をうけていた。原病に対する治療の為に、中心静脈カテーテルが挿入されていた。中心静脈カテーテルが点滴に使用されている8症例をA群とし、ヘパリン加生理食塩水にてロックされている10症例をB群とした。

### 検体採取方法

A群については、まず3方活栓より点滴内容物を採取し(サンプルA)、次に患者の血液を中心静脈ラインより5ml採取し(サンプルB)、更に5mlを採取した(サンプルC)。

B群については、まずヘパリン加生理食塩水5mlを採取し(サンプルD)、ついで血液5mlを採取した(サンプルE)。

Controlとして両群とも末梢血を採取した。また、サンプルAよりEはサブロー培地にて培養を行った。

### 真菌抗原測定

以上のサンプルのBDG値、アスペルギルス抗原をEIA法、LA法にて測定した。

### カテーテル、フィルターのBDG検査への影響の検討

ニトロセルロースで構成された透析膜はBDG検査値を上昇させることが知られている。当科では中心静脈ラインにポリウレタン製中心静脈カテーテル、フィルターを使用しているが、これがBDG測定値に影響するかどうか検討するため、当科で使用されてるフィルター(ニプロフィルターFG20BW-N7<sup>TM</sup>, ニプロ)(ニプロフィルターFG20BT-N2<sup>TM</sup>, ニプロ), カテーテル(argyle<sup>TM</sup>, 日本シャーウッド)を通した蒸留水のBDG値を測定した。

## 【結果】

### 1) IPA早期診断における胸部CTと抗原検査の比較検討

#### 患者特徴

120症例の造血器悪性腫瘍症例を対象とした。原疾患は急性骨髄性白血病30症例、急性リンパ性白血病25症例、慢性骨髄性白血病13症例、慢性リンパ性白血病1症例、非ホジキンリンパ腫35症例、ホジキン病2症例、骨髄異形成症候群7症例、それ以外7症例であった。平均年齢は50.0歳(16歳-81歳)。39症例は原病が抗癌剤治療に抵抗性であった。

#### IPAの頻度

120症例中、IPAと診断されたのは19症例であった(15.8%)。確診例は8例で、すべて剖検にて診断された。19症例中、13症例が死亡した(68.4%)。このうち、7症例はアスペルギルス症が主たる死因となった。19症例の内訳を表1に示す。

#### 深在性カンジダ症・他の細菌感染症の頻度

深在性カンジダ症と診断されたのは1症例であった。その症例は血液培養より*Candida tropicalis*が検出され、カテーテル抜去と共に解熱した。剖検にて播種性カンジダ症を確認した症例はなかった。

6症例が血液培養、或いは剖検にて敗血症、ないし細菌感染症と診断された。この内訳は、MRSA 1例、*Enterococcus faecalis* 1例、*Enterococcus faecium* 1例、*Pseudomonas aeruginosa* 2例、*Xanthomonas maltophilia* 1例であった。*P. carinii*が証明された症例はなかった。

#### surveillance culture

**咽頭培養** 115症例に対し、合計1095回の培養検査を施行した。真菌が分離された症例は29症例あり、内訳は*Candida albicans* 13症例、*Candida glabrata* 5症例、*Candida krusei* 6症例、*Candida tropicalis* 5症例、*Candida spp.* 5症例、酵母様真菌2症例であった。

**尿培養** 118症例に対し、合計1021回の培養検査を施行した。真菌が分離された症例は5症例あり、内訳は*Candida albicans* 2症例、*Candida glabrata* 3症例、*Candida krusei* 0症例、*Candida tropicalis* 0

表1: IPA症例の特徴

症例	年齢	性別	原疾患	原病の状態	IPAの信頼度	AMPH-Bへの反応	予後	主な死因
1	66	男	非ホジキンリンパ腫	改善	確診	不応性	死亡	中枢神経アスベルギルス症
2	69	女	慢性骨髓性白血病	不応性	確診	不応性	死亡	中枢神経アスベルギルス症
3	63	男	急性骨髓性白血病	不応性	確診	不応性	死亡	浸潤性肺アスベルギルス症
4	26	男	骨髓異形成症候群	改善	疑い	改善	生存	
5	34	男	慢性骨髓性白血病	改善	疑い	改善	生存	
6	37	女	急性骨髓性白血病	不応性	疑い	不応性	死亡	中枢神経アスベルギルス症
7	26	男	急性リンパ性白血病	不応性	疑い	不応性	死亡	浸潤性肺アスベルギルス症
8	77	男	慢性リンパ性白血病	不応性	疑い	不応性	死亡	浸潤性肺アスベルギルス症
9	64	男	急性リンパ性白血病	不応性	確診	改善	生存	細菌性肺炎
10	50	男	慢性骨髓性白血病	不応性	確診	不応性	死亡	白血球
11	76	男	急性リンパ性白血病	不応性	確診	不応性	死亡	白血球
12	39	男	骨髓異形成症候群	不応性	疑い	不応性	死亡	細菌性肺炎
13	24	男	急性リンパ性白血病	改善	疑い	改善	生存	細菌性肺炎
14	16	男	急性骨髓性白血病	不応性	疑い	改善	死亡	
15	52	女	慢性骨髓性白血病	改善	疑い	改善	生存	
16	40	男	急性骨髓性白血病	改善	確診	不応性	死亡	浸潤性肺アスベルギルス症
17	61	男	骨髓異形成症候群	不応性	疑い	改善	死亡	間質性肺炎
18	23	男	急性リンパ性白血病	改善	疑い	改善	生存	
19	56	女	ホジキン病	不応性	疑い	改善	生存	

症例であった。

便培養 106症例に対し、合計884回の培養検査を施行した。真菌が分離された症例は51症例あり、内訳は*Candida albicans* 17症例、*Candida glabrata* 31症例、*Candida krusei* 8症例、*Candida tropicalis* 3症例、*Trichosporon* 5症例、*Candida spp.* 11症例、酵母様真菌8症例であった。

鼻腔培養 培養検査でアスペルギルス属を検出した症例は存在しなかった。

### 血液検査

IPA19症例中、それぞれ10、12症例がLA、BDGが陽性化した。感度と特異度はLAが53%、93%であり、BDGは63%と89%であった。LA、BDGが陽性となった症例では、平均して発熱後25.8日、25.6日目に陽性化した。

LAについては、合計872サンプルを採取した。その内訳は、124のIPAサンプルと748のnon-IPAサンプルである。124のIPAサンプル中、24サンプルがLA法陽性で(23%)、748のnon-IPAサンプルのうち16サンプルがLA法陽性となった(2%)。サンプルベースの解析では感度・特異度は23%・98%となった。BDGについては、合計885サンプルを採取した。その内訳は、129のIPAサンプルと704のnon-IPAサンプルである。129のIPAサンプル中、34サンプルがBDG陽性で(26%)、704のnon-IPAサンプル中、32サンプルがBDG陽性であった(5%)。サンプルベースの解析では感度・特異度は26%・95%となった。

IPA症例のうちLAが陽性化しなかった症例は9症例存在したが、6症例はIPAが改善した。一方、LAが陽性化した症例10症例中、IPAが改善したのは3症例であった ( $p=0.1789$ )。同様に、BDGが陽性化しなかった症例は7症例存在するが、6症例はIPAが改善した。しかし、BDGが陽性化した症例12症例中でIPAが改善したのは3症例であった。BDGの陽性化はIPAの予後不良因子と考えられ、これは統計的に有意であった( $p=0.0198$ )。

### 胸部単純X線写真

IPA 19症例中、12症例に単純X線写真にて何らかの異常陰影を認めた。その内訳は、境界不明瞭な浸潤陰影が6症例、空洞を伴な

い腫瘍陰影が4症例、胸水貯溜が5症例であった。診断時にはair-crescent signと楔状浸潤陰影は認めなかった。他の7症例は単純X線写真では異常を指摘できなかった。この7症例のうち、4症例は血液検査、単純X線写真が陰性であったために、胸部CTを撮影しなかった場合、IPAと診断されなかった。胸部X線写真は平均して発熱後17.9日目に異常所見を呈した(表2)。

胸部X線写真で異常所見を呈さなかった症例7例のうち、5症例でIPAが改善した。しかし、単純X線写真で異常所見を呈した12症例のうち、IPAが改善したのは4症例であった( $p=0.01698$ )。

表2: 胸部CT、胸部X線、LA、BDGの陽性化の時期

患者番号	CT# (日)	胸部X線# (日)	LA# (日)	BDG# (日)
1	5	6	19	19
2	31	31	31	31
3	29	29	9	9
4	18	ND	17	36
5	16	16	69	27
6	9	23	43	49
7	5	20	12	15
8	20	20	32	25
9	9	16	16	16
10	3	10	10	ND
11	7	10	ND	18
12	18	ND	ND	53
13	16	ND	ND	9
14	11	ND	ND	ND
15	5	ND	ND	ND
16	8	ND	ND	ND
17	14	22	ND	ND
18	35	ND	ND	ND
19	12	12	ND	ND
平均±標準偏差	15.1±9.3	17.9±7.7	25.8±18.8	25.6±14.4

# 発熱してから各種検査が陽性化するまでの期間

略; ND: not detected

表3; IPAの予後と胸部X線検査、CT検査、血液検査の関係

			IPAが改善した症例/全症例	p value
患者の状態	性別	男性	7/15	>0.9999
		女性	2/4	
	年齢	>50	4/10	0.6563
		<50	5/9	
	原病の状態	反応性	5/7	0.1698
		不応性	4/12	
胸部CT検査	halo sign	陽性	2/5	>0.9999
		陰性	7/14	
	多発性腫瘍陰影	多発性	8/17	>0.9999
		単発性	1/2	
	腫瘍陰影の最大径	>15mm	6/12	>0.9999
		<15mm	3/7	
	病変分布	両側	5/11	>0.9999
		片側	4/8	
胸部X線検査	異常所見	陽性	4/12	0.1698
		陰性	5/7	
血液検査	LA	陽性	3/10	0.1789
		陰性	6/9	
	BDG	陽性	3/12	0.0198*
		陰性	6/7	

解析はFisherの直接法、或いはカイ2乗検定を用いて行った。

\* 統計的に有意

## 2) 非IPA症例に生じるLA陽性の原因の解析

### 一過性アスペルギルス抗原血症

6症例より採取した7サンプルが「一過性アスペルギルス抗原血症」の定義を満たした(表4)。7サンプル中、6サンプルは好中球減少期間に採取された。一過性アスペルギルス抗原血症と診断された6症例の好中球減少期間は $18.3 \pm 13.5$ 日間であった。

保存されていた3検体を用いて、EIA法、アスペルギルス特異的プライマーを用いたPCR法を行ったところ、3サンプルすべてがEIA法陽性となった(表4)。PCRは十分量の検体が保存されていなかったため、2サンプルで行ったが、2サンプルとも陽性であった。

一過性アスペルギルス抗原血症と診断された7サンプルのBDG値は $4.6 \sim 42.5$  pg/mlで、3サンプルが陽性と判断された(表4)。

好中球低下期間に採取した204のnon-IPAサンプル中、6サンプルが一過性アスペルギルス抗原血症と診断された。一方、好中球回復時に採取した544のnon-IPAサンプル中、一過性アスペルギルス抗原血症と診断されたのは1つだけであった。好中球減少と一過性アスペルギルス抗原血症出現率のあいだには統計的に有意な関連を認めた( $p=0.0023$ )。この両者の関係を図2に示した。

### 汚染・交差反応の影響

好中球減少を伴わない免疫抑制症例より採取した検体、意図的に汚染した健常人血清、薬剤を添加した健常人血清はすべてLA法陰性であった。また、薬剤添加によりラテックス凝集反応が阻害された産物はなかった。

### LA法の結果と好中球数の関係

LA法は21症例にて陽性となった。11症例は好中球数低下期間のみ陽性となったが、IPAを発症したのは2症例であった(18%)。一方、好中球回復後に、1回以上LA法が陽性となった症例は10症例存在したが、このうち8症例はIPAを発症した(表5)。この10症例のうち、5症例は好中球減少時にもLA法は陽性となった。残りの5症例は好中球回復後にのみ陽性となった。好中球数とLA法の結果には統計的に有意な相関を認めた( $p=0.0089$ )。

表4；一過性アスベルギルス抗原血症サンプル一覧

サンプル	性	年齢	原疾患	原疾患の状態	好中球数 (/ul)	一過性アスベルギルス抗原血症サンプル/全採取サンプル	ELISA ( $\mu$ g/ml)	PCR	BDG (pg/ml)	好中球減少期間 (日)
1	女	56	急性骨髄性白血病	完全寛解	247	1/8	施行せず	施行せず	15.3	18
2	男	61	非ホジキンリンパ腫	不応性	243	1/3	30.3	施行せず	8.7	9
3	男	81	急性骨髄性白血病	完全寛解	24	1/10	施行せず	施行せず	25.6	48
4	女	17	急性リンパ性白血病	完全寛解	0	2/13	23.1	positive	32.3	10
5	女	17	急性リンパ性白血病	完全寛解	0	2/13	21.3	positive	4.6	13
6	男	63	急性骨髄性白血病	不応性	272	1/8	施行せず	施行せず	9.2	16
7	男	37	急性骨髄性白血病	完全寛解	510	1/13	施行せず	施行せず	42.5	14
平均±標準偏差		47.4 ± 24.5			73.4 ± 130.2				19.7 ± 14.1	18.3 ± 13.5

\* ELISA法のcut-off値は1.0  $\mu$ g/mlとした。

図2；好中球数と一過性アスペルギルス抗原血症の関係

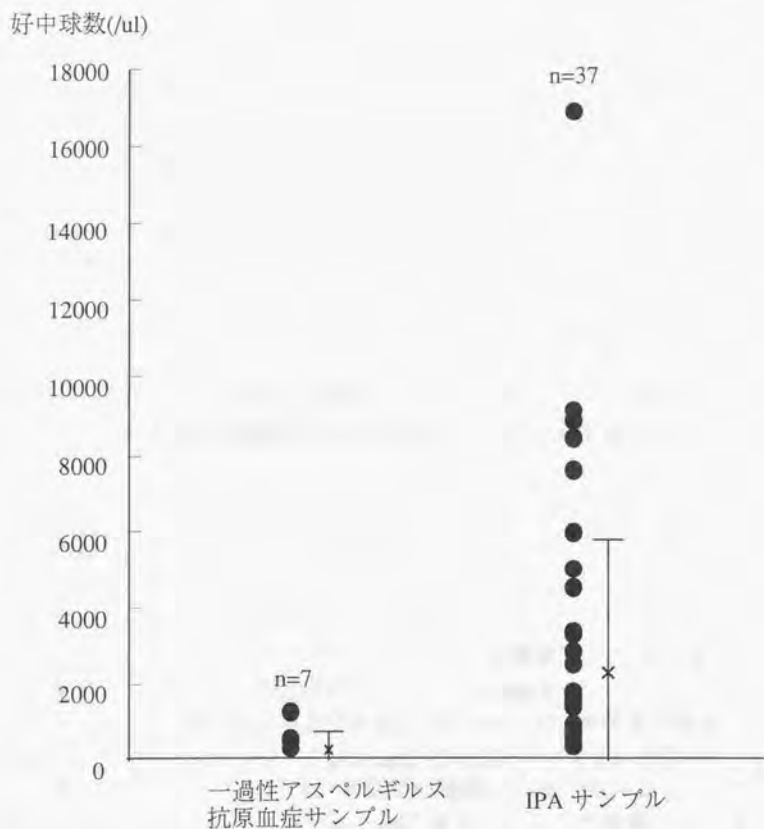


表5；好中球数とLA法の関係

	IPA症例数	non-IPA症例数	合計
好中球回復時にLA法が陽性となった症例	8	2	10
好中球低下時のみLA法が陽性となった症例	2	9	11
合計	10	11	21

### アスペルギルス抗原血症単独陽性と好中球低下期間の関係

非IPA症例のうちアスペルギルス抗原が陽性化したのは11症例であった。このうち、6症例が「一過性アスペルギルス抗原血症」とみなされた。IPA症例のうち、IPAが診断される前に（画像的に病巣を検出する前に）アスペルギルス抗原が陽性になった症例は2例であった。合計13症例がIPA診断前に抗原検査が単独陽性となっている。発病した症例とLA法が陽性となったがIPAとは診断されなかった症例を比較した場合、好中球低下期間に差をみとめた。IPA 2症例はいずれも原病が治療に反応せず、好中球低下期間はそれぞれ25日と32日と遷延した。一方、LA法が陽性となったがIPAとは診断されなかった症例の好中球低下期間は22.6日であり、特に一過性アスペルギルス抗原血症の症例では好中球低下期間は平均18.3日間であった。

## 3) 遺伝子診断方法の確立

### 1) アスペルギルスDNA抽出法の検討

簡易法で抽出したアスペルギルスDNAは増幅せず、酵素法は $10^3$ 希釈まで、ガラスビーズ法はガラスビーズ25 mgを用い、2, 5, 10, 20 分間vortex した場合は、それぞれ $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ 希釈まで増幅が可能であった。ガラスビーズ250 mgを用い、2, 5, 10, 20 分間vortex した場合は、 $10^3$ ,  $10^3$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ 希釈まで増幅が可能であった。 $10^4$ 希釈の場合、アスペルギルスDNA 2 ngに相当する。これ以降、ガラスビーズ250 mg, 20分間vortexのガラスビーズ法にてDNAを抽出することとした。

## 2) primerの設計

2-1)から2-3)まで増幅効率に大きな差異を認めず、2 ng相当のアスペルギルスDNAまで検出可能であった。2-4)のinner primerを用いた場合、20 fg相当のアスペルギルスDNAまで検出可能であった。nested PCRをかけることにより $10^6$ 感度が向上した(図3)。これ以降の実験では2-3)、2-4)のprimerを用いることとした。

## 3) 特異性の検討

上述の通り2-3)、2-4)のprimerを用いて検討した。*A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*はPCRにて、それぞれ384 bp, 357 bpの増幅産物をもとめた。一方、*Candida albicans*, *Candida grabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon beigelli*ではPCR産物は増幅されなかった。

## 4) 希釈サンプルからのDNA抽出効率の検討

DNA自体を希釈した場合、20 fgまでnested PCRにより検出可能であった。しかし、真菌自体を希釈した場合、2 pgまでしか検出できなかった。抽出操作により $10^2$ 感度が低下した。

## 5) LA法、EIA法との比較

LA法では $10^3$ 希釈まで検出可能であり、これはアスペルギルスDNAに換算して20 ng、アスペルギルスコピー数に換算して $10^7$ コピーに相当する。EIA法では $10^4$ まで検出可能であり、これはDNAに換算して2 ng、 $10^6$ コピーに相当する。

前述したように真菌自体を希釈してnested PCRを行った場合、 $10^7$ 希釈まで検出する。これはDNAに換算して2 pgで、アスペルギルスコピー数では $10^3$ コピーに相当する(表6)。nestをかけない場合、 $10^4$ までしか検出できず、EIA法とほぼ同じ感度である。

表6；アスベルギルス抗原検査、nested-PCR法の感度の比較

DNA濃度 (ul)	200 ng	20 ng	2 ng	200 pg	20 pg	2 pg	200 fg	20 fg	2 fg
nested PCR*	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陰性
conventional PCR*** LA法 ELISA法	DNAを希釈した場合	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陰性
	真菌自体を希釈した場合**	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陰性
		陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陰性
		陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陰性

\* 文中2-3, 2-4のprimerを用いた

\*\* ガラスビーズ法でDNAを抽出した。

\*\*\* 文中2-3のouter primerを用いてPCRを行った。

(a) 1st PCR



(b) nested PCR

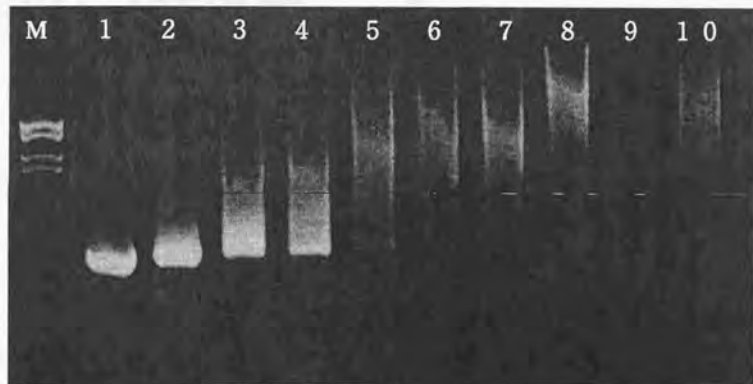


図 3 ; nested PCR の電気泳動

(a) 1st PCR, (b) nested PCR

M; marker (BM VI), Lane 1; positive control (20 ng of *Aspergillus fumigatus*),  
Lane 2 原液, Lane 3  $10^{-3}$  希釈, Lane 4  $10^{-4}$  希釈, Lane 5  $10^{-5}$  希釈, Lane 6  $10^{-6}$  希釈,  
Lane 7  $10^{-7}$  希釈, Lane 8  $10^{-8}$  希釈, Lane 9  $10^{-9}$  希釈, Lane 10 negative control

アスペルギルスの希釈系列より抽出したDNAに対し、nested PCRを行った。  
nested PCRにより Lane 7の $10^{-7}$ 希釈まで検出可能であった。これは2pgのアスペルギルスDNAに相する。

#### 4) 中枢神経アスペルギルス症の診断

##### 患者背景

中枢神経アスペルギルス症と診断された5症例の特徴を表7に示した。全ての症例が巣症状、意識障害などの神経症状を呈したが、髄膜刺激症状は認めなかった。5症例すべてが死亡した。1症例で剖検が行われ、アスペルギルスによる出血性梗塞症と診断された。この症例ではアスペルギルスによる髄膜浸潤が証明された。

培養検査 髄液培養ではアスペルギルスは検出されなかった。

真菌抗原検査 5症例中、4症例でLA法、EIA法が陽性となり、LA法・EIA法のあいだでの不一致は存在しなかった。コントロール群はすべて陰性であった。

nested PCR法 5症例すべてで、nested PCR法にてアスペルギルス特異的DNAを髄液より検出した。一方、コントロールサンプルは全て陰性であった。

##### 末梢血混入の影響の検討

症例1, 2, 5の末梢血を100, 1000倍に希釈した検体はすべてLA法、EIA法ともに陰性であった。

PCR法については症例1は100倍, 1000倍希釈サンプルとも陽性。症例2は100倍希釈サンプルのみ陽性。症例5はいずれも陰性であった。

表7; 中枢神経アスベルギルス症患者の特徴

番号	年齢/性別	原疾患	神経所見	CT或いはMRI所見	髄液検査 培養	ELISA	LA	PCR	剖検
1	50/男	急性リンパ性白血病	片麻痺、痙攣	多発性出血性梗塞	陰性	陽性	陽性	陽性	施行せず
2	38/女	急性骨髄性白血病	小脳失調	単発性小脳腫瘍	陰性	陽性	陽性	陽性	施行せず
3	38/男	急性骨髄性白血病	自律運動、意識消失	多発性脳腫瘍	陰性	陽性	陰性	陽性	施行せず
4	65/女	慢性骨髄性白血病	痙攣、意識消失	施行できず	陰性	陽性	陽性	陽性	出血性梗塞
5	25/男	急性リンパ性白血病	失見当識、意識消失	多発性脳腫瘍	陰性	陽性	陽性	陽性	施行せず

## 5) 感染経路の解明

### 中心静脈カテーテル採血のBDG値

A群；サンプルA  $12.6 \pm 13.9$  pg/ml、サンプルB  $28.0 \pm 16.3$  pg/ml、サンプルC  $19.2 \pm 8.7$  pg/ml、末梢血  $19.8 \pm 6.2$  pg/ml

B群；サンプルD  $69.3 \pm 37.0$  pg/ml、サンプルE  $26.1 \pm 13.4$  pg/ml  
末梢血； $14.6 \pm 7.0$  pg/ml

### 真菌培養

全て陰性であった。

### アスペルギルス抗原血症

A群のサンプルは全て陰性であった。B群の1サンプルでLA法、EIA法ともに陽性となった。

### フィルター・カテーテルの影響

フィルター、カテーテルを通した蒸留水のBDG値は $8.5 \pm 2.6$  pg/ml、 $9.2 \pm 4.7$  pg/mlであった。

### IPAの発症

全症例がIPAを発病していない。

## 【考察】

### 疫学的検討

当科における15.6%というIPAの発症頻度は、過去の報告とはほぼ同程度である(28)。現在の真菌感染対策を行った場合、この程度の発症は避けられないと考えられる。IPAは、患者の全身状態が不良の時に生じやすく、造血器悪性腫瘍症例では原病のコントロールがつかない場合に問題となることが多い。今回の調査でも、19症例のIPA症例のうち12症例は原病が化学療法に反応していないため、このような症例ではIPAの発症の有無に関わらず死亡した可能性が強い。しかし、原病が化学療法に反応した7症例にもIPAは発症し、そのうち2症例はIPAが死亡に関係した。このような症例は早期診断ができれば救命の可能性はある。

一方、深在性カンジダ症の頻度は当初の予想よりはるかに低かった(0.8%)。深在性カンジダ症の50%は血液培養が陽性化するため(29)、今回の我々の診断基準に問題があると考ええるよりは、カンジダ感染症自体が減少していると思われる。FCZの普及、AMPH-Bのempiric therapyの確立がカンジダ感染症のコントロールに貢献していると考えられる。近年、FCZ耐性のカンジダ感染症も報告されているが(30)、現時点では造血器悪性腫瘍におけるカンジダ感染症の予防、治療は有効に機能していると思われる。

surveillance cultureは早期診断目的に多くの施設でなされているが、有用性については意見が分かれている(31,32)。一般的には有用性は低いという報告が多い。今回の調査でも、surveillance cultureの結果はその後の感染症発症との相関を認めなかった。また特筆すべきは、アスペルギルスの鼻腔コロナイゼーションを認めた症例はなく、IPA発症との関連を認めなかった。従来指摘されてきた、アスペルギルス属の侵入経路が気道、鼻腔であるという報告とは対照的であった(29)。当科では鼻腔原発アスペルギルス症を発症した症例がないことを考慮すれば、鼻腔培養の結果は培養方法の問題より、鼻腔にアスペルギルスコロニーを形成している症例が少ないことを示唆するものと考ええる。

### 抗原検査と画像検査の比較検討

今回の検討より、胸部CT検査がIPAの早期診断にもっとも有効であると考えられた。本研究ではIPA疑いの診断基準にCT所見を用いているため、CT所見の感度については十分な評価はできない。しかし、剖検にてIPAを証明された8症例全てで、胸部CT検査が診断基準を満たすような異常所見を呈していることを考慮した場合、胸部CT検査の感度は比較的高いことが推察される。胸部CTではIPAに特異的と考えられるhalo, air-crescent signを認めた症例以外に、生存中の胸部CTでは多発性腫瘍陰影を認めたただけであったが、剖検時にIPAを確認した症例も存在した。今回の検討では、胸部CTでもっともよく認められるのは多発性腫瘍陰影であり、このサインはIPAの診断的価値を有すると思われる。しかし、多発性腫瘍陰影は粟粒結核、癌転移などでも報告されており、これのみを認めた場合のIPAとの鑑別は困難である。造血器悪性腫瘍症例における多発性腫瘍陰影についてはさらなる評価が必要である。

一方、胸部X線検査はIPA発症早期には変化を検出しないか、或いは非特異的所見を呈することが多い。IPA19症例中、7症例では胸部X線検査で異常所見は検出されなかった。また、異常所見が検出された12症例でも真菌感染を示唆する腫瘍陰影を呈したのは4症例のみであった。これに加え、胸部X線検査は胸部CT検査より、平均4.3日間病変検出が遅れることも問題である。この期間の診断遅延は好中球低下症例では致命的である。今回の検討で胸部X線検査のIPA早期診断における限界が証明された。

LA・BDGなどの血液検査も胸部CT検査と比較した場合、その感度は低いと考えられる。LA・BDGが陽性化したのは、それぞれ10症例、12症例である。さらに両者のいずれかが胸部CT検査より早期に陽性化したのは2症例である。平均してLAは胸部CT検査より11.3日間、BDG検査より10.3日間遅延する。この遅延は胸部X線検査と同様致命的である。血液検査は毎週1回定期的に行ったため、7日未満の差の臨床的意義は不明であるが、前述の11.3日、10.3日は各検査間の陽性化時期に有意な差があることを意味すると考えられる。IPAは好中球低下が遷延、或いは免疫抑制状態が遷延する症例に好発する。今回の研究でも、原病が化学療法に不応性となった症例、或いは骨髄移植後の症例に好発した。このような症例では、どのような種類であれ感染症の診断・治療が遅れることは予後を悪くする

と考えられる。この為、抗原検査に依存した診断では不十分であると考えられる。

血液中のアスペルギルス抗原は細網内皮系で急速に代謝されるため(33)、LA・BDGで血液中のアスペルギルス抗原を検出するためには、大量の抗原が持続的に供給されることが必要である。その様な大量の抗原を供給するためには、体内に何らかの感染巣が存在する必要がある。大部分のIPA症例では呼吸器、特に肺がアスペルギルスの侵入門戸となっていると考えられている。この為、初期病変は肺に形成され、胸部CTは早期にIPAを検出すると思われる。肺病変が増大して初めて末梢血液中にアスペルギルス抗原が供給されるため、LA・BDGの陽性化は遅延するのであろう。これらの検査が陽性化した症例の予後が陽性化しなかった症例より不良であることは、この感染真菌量に依存するものと考ええる。

さらに、経済的にも胸部CTと抗原検査の間には大きな差が存在する。1999年1月現在の保険制度下では、BDG・LA・胸部CTの1回あたりの費用は4000円・3000円・1800円で、1回あたりの費用は胸部CTの方がやすい。抗原検査の感度は高くないため、頻回の検査が必要であることを考慮すると、経済的には胸部CT検査の方が抗原検査より優れていると考えられる。

以上より、IPAの早期診断に血液中のアスペルギルス抗原測定の意味は少ないと考える。高度に肺への特異性を有するアスペルギルス症を、血液を用いて診断することには原理的に困難である。IPAの早期診断には胸部CTを撮影すべきである。

本研究の問題点は以下の点である。まず、19のIPA症例を取り扱っているが、これはサンプルサイズとして十分に大きいとはいえない。また、IPA症例の内、病変を病理的に確認できているのは8症例である。残りの11症例については臨床的に確立された診断基準を用いているが、IPAであったかどうかを確認する事はできない。サイトメガロウイルス肺炎・粟粒結核・肺ムコール症・癌転移などでhalo signが認められたとの報告も存在し(26)、画像検査の特異性には問題を有する。診断基準に問題が存在することは、本研究の根幹に関わる。しかし、臨床現場ではIPAは疑いの時点で治療を開始して、骨髄抑制中の症例に侵襲的検査を行うことが困難であることを考慮すると、この診断基準自体は妥当性の検討がすでになされてい

る以上(29)、今回の研究方法が真のIPA症例の近似としては不適当とは言えないと考える。このほかに腸管、鼻腔など肺以外より侵入するアスペルギルス症の存在が示唆されているが、今回の検討ではこのような場合に胸部CTが果たす役割は十分に検討できなかった。

#### 非IPA症例に起こる一過性の検討

今回の検討で、好中球減少時には非IPA症例でもLA法が陽性となることを確認した。当科では真菌感染を疑った場合、empiricに0.5 mg/kgのAMPH-Bを経静脈的に投与することになっている為、これがアスペルギルス抗原血症からIPAへの進行を抑制している可能性があると考えた。しかし、今回の研究ではnon-IPA症例の内、11症例がLA法陽性となったが、このうち6症例は我々の作った「一過性アスペルギルス抗原血症」の定義を満たし、empiricなAMPH-Bの投与を受けていない。この為、empiricな抗真菌療法が今回の結果に影響を与えた可能性は少ないと考えられる。

一過性アスペルギルス抗原血症の原因として、contaminationを最初に考えたが、意図的に汚染させた検体はすべて陰性であり、通常の採血条件では汚染する可能性は極めて少ないと思われる。つまりラテックス凝集反応は感度が低いため、汚染による擬陽性が生じる可能性は低いと考えられる。同様に常用薬剤を添加した血清も全てLA法陰性であり、また、特定の薬剤使用と一過性アスペルギルス抗原血症の出現に統計的関連は認められず (data not shown)、薬剤、及びその代謝産物との交叉反応の可能性は少ない。更に、一過性アスペルギルス抗原血症を呈したサンプルで保存検体が存在したものについては、アスペルギルス特異的PCR法とEIA法にて追加検討を行った。7つの一過性アスペルギルス抗原血症サンプルのうち、3サンプルが入手可能であった。EIAは3サンプルに、PCR法は2サンプルに行ったが、いずれも陽性であった。確かに少数例の検討ではあるが、この結果は一過性アスペルギルス抗原血症出現時には、何らかのアスペルギルス菌体が循環血液中に存在することを示唆している。

私は一過性アスペルギルス抗原血症・LA法擬陽性と好中球数の関係を、患者ベースとサンプルベースの2つの方法で解析した。擬陽性、或いは一過性アスペルギルス抗原血症とはサンプルベースの考

え方であるが、サンプルベースでの解析には統計的問題を伴う。それは各サンプルが統計的な意味で独立ではないからである。つまり今回のような場合、症例により好中球低下期間に採取されるサンプル数が異なるため、各サンプルは個体差の影響を受ける事になる。この為、患者ベースの解析が必要となる。しかし、患者ベースの解析では、一人の患者を好中球低下期間と好中球回復期間に分割して解析することができない。この為、統計的には若干の問題をふくむものの、両方の解析を行った。両方の解析方法で好中球数とLA法擬陽性、或いは一過性アスペルギルス抗原血症の発症の間に統計的有意差を認め、アスペルギルス抗原血症の結果は、患者の好中球数と関連することが示唆された。

この事は過去の報告とも一致する。LA法の特異性は90%以上と報告されているが(34, 35)、骨髄移植症例を対象とした解析ではその特異度・陽性的中率は低い傾向にある。Sulahian等は169症例の同種骨髄移植症例を対象にEIA法の有効性を検討した(36)。移植後1カ月以内に169症例中31症例にアスペルギルス抗原検査擬陽性を認め、この時期のEIA法の特異度は81%に低下していた。また、最近、Machettis等が骨髄移植症例のIPAの早期診断目的にEIA法とLA法を比較検討した前向き研究を報告したが(37)、そのなかでも同様の記載がなされている。彼らはEIA法の感度はLA法より良好であると結論しているが、EIA法の陽性的中率は50%でLA法の67%よりも劣っている。興味深いのは、擬陽性サンプルの大部分は移植後1カ月以内に生じていることである。これらの報告は、アスペルギルス抗原検査法の特異性は好中球低下時には低下するという今回の結果と一致する。

陽性的中率とはそもそも感度、特異度、罹患率の関数である。感度、特異度は各検査に固有のものであるため、陽性的中率は本来罹患率単独の関数となる。IPAの発症率は好中球低下時に増加するため、陽性的中率は好中球低下期間に上昇するはずである。しかし、今回の報告も含め、多くの研究はこれと反対の結果を示している。この原因は、好中球低下時にアスペルギルス抗原検査陽性がIPA発症と同義でないためであると考ええる。アスペルギルス抗原検査陽性は血液中にアスペルギルス真菌成分を含む事を高率に示すため、アスペルギルス抗原血症陽性症例はアスペルギルス抗原血症に罹患している可能性が強いが、臨床的にIPAを発症するためには何らかの

因子が追加される必要があるかもしれない。移植早期や化学療法後の好中球低下時期には、抗ガン剤・放射線照射による気道・腸管粘膜の損傷が生じ、アスペルギルスに代表される真菌の血中への移行が生じている為と考えられる。多くの症例では、腸管粘膜の損傷はその後改善するため、IPAに移行せず治癒するのであろう。

では、IPA診断前にアスペルギルス抗原が陽性となった症例を認めた場合、我々はどうの様に対処すべきであろうか？これは臨床的にもっとも重要な問題である。今回の研究ではIPA診断確定前にアスペルギルス抗原が陽性となった症例は2例存在した。LA法陽性となった非IPA症例は11症例存在したため、2/13症例(15.4%)がIPAへと進行したことになる。IPA 2症例はいずれも原病が治療に反応せず、好中球低下期間はそれぞれ25日と32日と遷延した。しかし、LA法陽性となった非IPA症例の好中球低下期間は22.6日であり、特に一過性アスペルギルス抗原血症の症例では好中球低下期間は平均18.3日間であったことは注目に値する。好中球低下時に一過性アスペルギルス抗原血症がおこり、その後にIPAへと発症するのは好中球低下が遷延する症例であると考えられる。我々は好中球低下時にアスペルギルス抗原血症が陽性となった場合、予想される好中球低下期間を考慮にいれ、治療を選択すべきである。

#### 遺伝子診断法の確立

私は好中球低下が遷延する症例で、IPAの高危険群を同定する為にはPCR法が有効であると考え、系の確立を始めた。その上で最大の問題となったのは、臨床検体のような含有アスペルギルス菌体量が少ないサンプルでは効率よくDNAを抽出する事が困難であるという事である。予備実験でサブロー培地上のコロニーを直接ピックアップしてPCR反応液にくわえる事を3回行ったが、1回しかアスペルギルス特異的DNAを検出できなかった(data not shown)。アスペルギルスが有する細胞壁が、大腸菌の細胞膜などと比較して頑強であるためであり、この細胞壁の存在が真菌のPCR法を困難ならしめている。

この為、アスペルギルス細胞壁を破壊する有効な方法の開発が最初の問題となった。過去に報告されている論文の多くはPCR法の感

度をDNAの希釈系列で測定しており、Yamakami等の報告でもnested PCRを用いる事により20 fgのアスペルギルスDNAを検出できるといっている(17)。しかし、臨床検体を用いた彼らの報告ではPCR法の感度はLA法やEIA法と大きな差はない。わたしは、これはDNA抽出の効率が菌体量により変化するためだと考え、上述の実験を行った。予想通り、希釈したサンプルでは100倍効率が低下し、通常の酵素法でアスペルギルスDNAを抽出した場合、LA法やEIA法と感度が変わらない事がわかった。PCR法を用いた場合、真菌DNA抽出のステップが入るため、アスペルギルス抗原検査との感度の差は期待されるほど大きくはならないのである。

このように、臨床検体からのアスペルギルスDNA抽出は、少量のDNAをいかに効率よく抽出するかにかかっている。このため、私は希釈系列を用いて、酵素法とガラスビーズ法でのDNA抽出能率を比較検討してみた。ガラスビーズ法では粉碎時間を振り分けて検討した。血清中に大量に存在するDNaseを失活させるため、phenol処理をガラスビーズ処理と同時にを行い、細胞壁の物理的破壊を完全におこさせることを目的としてガラスビーズ処理を20分間に延長した。また、血清中に存在する蛋白質を完全に除去するため、フェノール/クロロホルム処理を繰り返した。この結果、ガラスビーズ法の方が酵素法よりDNA抽出効率がよく、手技が簡便である点もあり、この方法を標準とした。ちなみに手技が簡便である市販の酵母用真菌DNA抽出キットなども試してみたが、臨床検体よりは回収できなかった。

DNA抽出効率の改善によりPCR反応の成績は向上したが、臨床検体をあつかう場合、DNAの損失は不可避であり、通常のPCR法では感度に限界があると考えられた。この為、nested PCRを行うこととした。確かにnested PCR法により検出感度はアスペルギルスDNA量20 fgにまで改善し、定性的PCRの系の確立に成功した。しかし定性的PCRには2つの問題点が存在する。1つは、コンタミネーションである。Nested PCRを行うために、PCR産物のコンタミネーションの可能性の他に、実験室内に存在するアスペルギルスを増幅してしまう可能性が考えられた。同様の内容を Bretagne等も報告しており(27)、臨床検体で日常的にnested PCR法を用いてアスペルギルス診断をつけるのは技術的困難を有する。2つ目は好中球減少期間には一

過性のアスペルギルス真菌血症を生じている可能性があり、好感度の検査を用いることでIPAについてはoverdiagnosisになる可能性がある。定性的PCRは髄液などの無菌部位の評価には有効であるが、血液を対象とした場合には定量性が必要と考えられる。

現在、我々は大塚製薬と共同で 'real time automated PCR'を用いた定量的PCRの系の確立につとめている。real time automated PCRとはプライマー間の塩基配列にハイブリダイズするようなプローブを特殊な蛍光でラベルし、PCR反応の過程でDNA polymeraseの5' nuclease 活性によりオリゴプローブより切り離されてはじめて蛍光シグナルを発するように設計したものである(38)。この蛍光を定量する事で、PCR産物の定量が可能となる。この方法は従来の希釈、あるいはcompetitive PCRと比較して定量性が優れていることが報告されている(38)。この方法を用いてnested-PCR産物の定量を行うことになる。現在、条件検討中である。

#### 中枢神経アスペルギルス症の診断

今回の検討では中枢神経アスペルギルス症の非侵襲的診断法として、髄液の抗原検査・PCR法の有用性が示唆された。従来、アスペルギルスの髄膜浸潤は稀と考えられていたが(20)、抗原検査やPCR法を用いる事によりアスペルギルスの髄液への感染・波及は過去の報告よりも高頻度であることが判明した。中枢神経アスペルギルス症では髄膜播種、あるいは髄液に感染するアスペルギルスの菌体量は少量であるため、髄液培養検査、一般病理検査では確認されることがなく、これまで注目されることが少なかったと考えられる。全症例で髄膜刺激症状が存在しなかったことも興味深い。これまでにVerweij等のグループが中枢神経アスペルギルス症を抗原検査とPCR法を用いて診断した症例を報告しただけで(39)、本研究は中枢神経アスペルギルス症における髄液検査の意義を検討した初めての報告である。これまで中枢神経アスペルギルス症の診断は開頭生検、経皮針生検などの侵襲的方法を用いおり、造血器悪性腫瘍症例に施行することは困難であった。今回、報告した抗原検査・PCR法はこの様な症例で非常に有用であることが予想される。

今回の検討には以下の問題点が存在すると考える。まず、取り扱った症例数の少ない点で、提唱した診断法の有効性は更なる検討が

必要である。しかし、中枢神経アスペルギルス症の発症頻度は少なく、また全例で、生前、或いは死後に髄液検体を採取できるわけではない点を考慮すると、多施設の協力が必要となる。第2点としては今回取り扱った5症例のうち、病理学的に診断が確定してるのは1症例しかないことである。この事は今回とりあげた診断方法の有効性を検討する前提であり、この前提に不確実性を有することは本研究の重大な問題点である。しかし、IPAの存在と特徴的な頭部画像所見を考慮すれば中枢神経アスペルギルス症が存在した可能性は高く、臨床現場では中枢神経アスペルギルス症として治療を開始するのが妥当である。私は今回の検討で髄液抗原検査、及びPCR法によるアスペルギルス特異的DNAの検出の有効性の評価を十分に行えたとは思わないが、これまで非侵襲的検査法がなかった中枢神経アスペルギルス症の新たな診断法を提唱したという意味で本研究の存在意義があると考ええる。

### 感染経路

今回の検討により、中心静脈カテーテルにアスペルギルス菌体成分が存在することがわかった。ラテックス凝集反応という比較的感度の低い検査で陽性化しているため、大量のアスペルギルス真菌成分が存在したと考えられる。その頻度は18症例中、1症例で高くないが、好中球低下が遷延する症例では感染源となりうる。静脈ラインを介してIPAが院内感染を起こしたという報告はないが、ラインは直接血管に侵入できるという点で感染源としての重要性は大きい。ラインを介してアスペルギルスが循環血液中に侵入した場合、最初に肺循環で捕捉されるため、IPAとして発症する可能性は十分に考えられる。ただ、今回の我々の検討は感染の可能性を示唆しただけでカテーテルを介した感染症の成立を証明したわけではない。また、今回は検討しなかったがカテーテル刺入部の評価も重要であると思われる。今後、prospectiveな検討を行う必要がある。

我々は高感度の検査である抗原検査を取り入れることで、カテーテル上のアスペルギルス菌体成分の存在を検出した。Patterson等も抗原検査を用いて院内のサーベイランスを行う事の有用性を報告しており(40)、今後、抗原検査を用いたサーベイランスはアスペルギルスのような培養困難な真菌のスクリーニング方法として普及する可

能性がある。抗原検査は培養と比較すれば感度良好だが、PCR法ほどたかくなく、空中を浮遊する少量のアスペルギルス菌糸が混入する程度では陽性にはならない。この為、抗原検査は一定量のアスペルギルスの存在を検出して、サーベイランス検査として有用である可能性がある。

BDG値とアスペルギルス抗原検査の解離の原因については不明である。培養陰性であったが、皮膚に常在するカンジダの関与をもっとも考えている。このカンジダも持続的に血液内に侵入していると考えられるが、当科の症例は全例がFCZの予防投与を受けており、比較的FCZに感受性を有するために全身性カンジダ症へは進展していないものとする。

### 【結語】

・IPAの早期診断としては胸部CTの感度が最も高く、もっとも発病早期に陽性化する。特異性については更なる検討が必要である。

・LA、BDGなどの血液検査の感度は50-60%程度で、胸部CTより陽性化が10日程度遅延する。

・好中球低下期間中には非IPA症例でもアスペルギルス抗原血症が生じている可能性があり、骨髄の回復とともに改善している可能性がある。抗原検査の結果を解釈する際には、患者の全身状態を評価する必要がある。

・臨床検体、特に血清を用いたPCR反応は、DNAの抽出が困難である。我々はガラスビーズ法を用いアスペルギルスよりDNAを抽出しnested PCRを用いた遺伝子検査の系を確立した。

・中枢神経アスペルギルス症の非侵襲的特異的検査方法として、髄液のアスペルギルス抗原検査、PCR法を用いたアスペルギルス特異的DNAの検出が存在する。

・アスペルギルス症は中心静脈カテーテルを介して感染する可能性がある。

## 【引用】

1. Bonten MJ, Hayden MK, Nathan C, et al. Epidemiology of colonisation of patients and environment with vancomycin-resistant enterococci. *Lancet* 1996;348(9042):1615-9.
2. Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* 1997;350(9092):1670-3.
3. Jansen J, Cromer M, Akard L, Black JR, Wheat LJ, Allen SD. Infection prevention in severely myelosuppressed patients: a comparison between ciprofloxacin and a regimen of selective antibiotic modulation of the intestinal flora. *Am J Med* 1994;96(4):335-41.
4. Pizzo PA. Management of fever in patients with cancer and treatment-induced neutropenia. *New Engl J Med* 1993;328(18):1323-32.
5. Hughes WT, Armstrong D, Bodey GP, et al. 1997 guidelines for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with unexplained fever. Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 1997;25(3):551-73.
6. Prentice HG, Kho P. Clinical strategies for the management of cytomegalovirus infection and disease in allogeneic bone marrow transplant. *Bone Marrow Transplant* 1997;19(2):135-42.
7. Boeckh M, Myerson D, Bowden RA. Early detection and treatment of cytomegalovirus infections in marrow transplant patients: methodological aspects and implications for therapeutic interventions. *Bone Marrow Transplant* 1994;14(Suppl 4):S66-70.
8. Kanda Y, Chiba S, Suzuki T, Kami M, Yazaki Y, Hirai H. Time course analysis of semi-quantitative PCR and antigenaemia assay for prevention of cytomegalovirus disease after bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 1998;100(1):222-5.
9. Meyers JD. Fungal infections in bone marrow transplant patients. *Seminars in Oncology* 1990;17(3 Suppl 6):10-3.
10. Goodman JL, Winston DJ, Greenfield RA, et al. A controlled trial of fluconazole to prevent fungal infections in patients undergoing bone marrow transplantation. *New Engl J Med* 1992;326(13):845-51.

11. Caillot D, Casasnovas O, Bernard A, et al. Improved management of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients using early thoracic computed tomographic scan and surgery. *J Clin Oncol* 1997;15(1):139-47.
12. Kuhlman JE, Fishman EK, Siegelman SS. Invasive pulmonary aspergillosis in acute leukemia: characteristic findings on CT, the CT halo sign, and the role of CT in early diagnosis. *Radiol* 1985;157(3):611-4.
13. Tanaka S, Aketagawa J, Takahashi S, Shibata Y, Tsumuraya Y, Hashimoto Y. Inhibition of high-molecular-weight-(1 $\rightarrow$ 3)-beta-D-glucan-dependent activation of a limulus coagulation factor G by laminaran oligosaccharides and curdlan degradation products. *Carbohydrate Res* 1993;244(1):115-27.
14. Verweij PE, Stylen D, Rijs AJ, de Pauw BE, Hoogkamp-Korstanje JA, Meis JF. Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay compared with Pastorex latex agglutination test for diagnosing invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *J Clin Microbiol* 1995;33(7):1912-4.
15. Obayashi T, Yoshida M, Mori T, et al. Plasma (1 $\rightarrow$ 3)-beta-D-glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. *Lancet* 1995;345(8941):17-20.
16. Verweij PE, Latge JP, Rijs AJ, et al. Comparison of antigen detection and PCR assay using bronchoalveolar lavage fluid for diagnosing invasive pulmonary aspergillosis in patients receiving treatment for hematological malignancies. *J Clin Microbiol* 1995;33(12):3150-3.
17. Yamakami Y, Hashimoto A, Tokimatsu I, Nasu M. PCR detection of DNA specific for *Aspergillus* species in serum of patients with invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 1996;34(10):2464-8.
18. Einsele H, Hebart H, Roller G, et al. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J Clin Microbiol* 1997;35(6):1353-60.
19. Young RC, Bennett JE, Vogel CL, Carbone PP, DeVita VT. Aspergillosis. The spectrum of the disease in 98 patients. *Medicine* 1970;49(2):147-73.
20. Walsh TJ, Hier DB, Caplan LR. Aspergillosis of the central nervous

system: clinicopathological analysis of 17 patients. *Ann Neurol* 1985;18(5):574-82.

21. Gordon MA, Holzman RS, Senter H, Lapa EW, Kupersmith MJ. *Aspergillus oryzae* meningitis. *JAMA* 1976;235(19):2122-3.

22. Boes B, Bashir R, Boes C, Hahn F, McConnell JR, McComb R. Central nervous system aspergillosis. Analysis of 26 patients. *J Neuroimaging* 1994;4(3):123-9.

23. Sorensen AG, Buonanno FS, Gonzalez RG, et al. Hyperacute stroke: evaluation with combined multisection diffusion-weighted and hemodynamically weighted echo-planar MR imaging. *Radiol* 1996;199(2):391-401.

24. Kami M, Shirouzu I, Mitani K, et al. Early diagnosis of central nervous system aspergillosis with combination use of cerebral diffusion-weighted echo-planar magnetic resonance image and polymerase chain reaction of cerebrospinal fluid. *Intern Med* 1999; in press.

25. Rath PM, Ansorg R. Value of environmental sampling and molecular typing of aspergilli to assess nosocomial sources of aspergillosis. *J Hosp Infect* 1997;37(1):47-53.

26. Libshitz HI, Pagani JJ. Aspergillosis and mucormycosis: two types of opportunistic fungal pneumonia. *Radiol* 1981;140(2):301-6.

27. Bretagne S, Costa JM, Marmorat-Khuong A, et al. Detection of *Aspergillus* species DNA in bronchoalveolar lavage samples by competitive PCR. *J Clin Microbiol* 1995;33(5):1164-8.

28. Denning DW, Tucker RM, Hanson LH, Stevens DA. Itraconazole in opportunistic mycoses: cryptococcosis and aspergillosis. *J Am Acad Dermatol* 1990;23(3 Pt 2):602-7.

29. Denning D, Evans E, Kibbler C, et al. Guidelines for the investigation of invasive fungal infections in haematological malignancy and solid organ transplantation. British Society for Medical Mycology. *Europ J Clin Microbiol & Infect Dis*. 1997;16(6):424-36.

30. Conly J, Rennie R, Johnson J, Farah S, Hellman L. Disseminated candidiasis due to amphotericin B-resistant *Candida albicans*. *J Infect Dis* 1992;165(4):761-4.

31. Guiot HF, Fibbe WE, van 't Wout JW. Risk factors for fungal infection in patients with malignant hematologic disorders: implications for empirical therapy and prophylaxis. *Clin Infect Dis* 1994;18(4):525-32.
32. Sanford GR, Merz WG, Wingard JR, Charache P, Saral R. The value of fungal surveillance cultures as predictors of systemic fungal infections. *J Infect Dis* 1980;142(4):503-9.
33. Bennett JE, Friedman MM, Dupont B. Receptor-mediated clearance of *Aspergillus* galactomannan. *J Infect Dis* 1987;155(5):1005-10.
34. Verweij PE, Rijs AJ, De Pauw BE, Horrevorts AM, Hoogkamp-Korstanje JA, Meis JF. Clinical evaluation and reproducibility of the Pastorex *Aspergillus* antigen latex agglutination test for diagnosing invasive aspergillosis. *J Clin Pathol* 1995;48(5):474-6.
35. Rogers TR, Haynes KA, Barnes RA. Value of antigen detection in predicting invasive pulmonary aspergillosis. *Lancet* 1990;336(8725):1210-3.
36. Sulahian A, Tabouret M, Ribaud P, et al. Comparison of an enzyme immunoassay and latex agglutination test for detection of galactomannan in the diagnosis of invasive aspergillosis. *Europ J Clin Microbiol & Infect Dis* 1996;15(2):139-45.
37. Machetti M, Feasi M, Nordini N, et al. Comparison of an enzyme immunoassay and a latex agglutination system for the diagnosis of invasive aspergillosis in bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 1998;21(9):917-22.
38. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996;6(10):986-94.
39. Verweij PE, Dompeling EC, Donnelly JP, Schattenberg AV, Meis JF. Serial monitoring of *Aspergillus* antigen in the early diagnosis of invasive aspergillosis. Preliminary investigations with two examples. *Infection* 1997;25(2):86-9.
40. Patterson JE, Zidouh A, Minitier P, Andriole VT, Patterson TF. Hospital epidemiologic surveillance for invasive aspergillosis: patient demographics and the utility of antigen detection. *Infect Control & Hosp Epidemiol* 1997;18(2):104-8.

## 【謝辞】

・研究活動一般に御指導いただきました矢崎義雄教授、平井久丸助教授に心より感謝申し上げます。

・実験の基礎より御指導頂いた小川誠司先生、半下石 明先生に心より感謝申し上げます。

・病棟で患者の診察にあたって頂いた千葉 滋先生、三谷絹子先生、本田浩章先生、小川誠司先生、病棟指導医、研修医、看護婦のかたがたに心より感謝申し上げます。

・検体採取・データ収集・データ解析に御協力を頂いた田中祐次先生、松村有子先生に心より感謝申し上げます。

・貴重な検体を御提供いただき、また、研究方法につき貴重な助言を頂きました国立国際医療センター血液内科神田善伸先生に心より感謝申し上げます。

・胸部CT、単純X線の読影に御協力を頂きました当院放射線科増本智彦先生に心より感謝申し上げます。

・アスペルギルス菌株を御供与頂いた当院検査部米山彰子先生に心より感謝申し上げます。

・統計処理の御指導を頂きました都立駒込病院 森慎一郎先生に心より感謝申し上げます。

・貴重な検体を御提供いただいた都立駒込病院坂巻壽先生、町田詩子先生、守矢明子先生に心より感謝申し上げます。

・PCR法の開発に御協力いただいた大塚製薬河野豊廣様に心より感謝申し上げます。

・アスペルギルス抗原検査の御指導、御協力を賜った株式会社富士レビオ半沢悟様に心より感謝を申し上げます。

・ $(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-D-glucan}$ 測定において御指導、御協力を賜ったBML ウイルス血清部伴 文彦先生、田中啓介様に心より感謝申し上げます。

・抗原血症、PCR法について御相談にのって頂きました帝京大学真菌研究センター榎村浩一先生に心より感謝申し上げます。

