

教育シリーズ：Deep-seated mycosis

侵襲性アスペルギルス症の診断

吉 田 耕一郎

近畿大学医学部附属病院安全管理部感染対策室

1. はじめに

医療技術の進歩や人口の高齢化などに伴い、免疫不全宿主は増加している。このため日和見感染症として発症する侵襲性アスペルギルス症（IA）も増加傾向にあり¹⁾、本症の臨床的重要性はきわめて高い。

IA は血液悪性腫瘍の化学療法や造血幹細胞移植が行われた患者、免疫抑制薬を使用中の患者など、免疫状態の低下した患者に発症し急速に増悪する。近年、臨床現場に導入された新規抗真菌薬は、IA の予後改善に一定の効果を示していると期待される。しかし、本症発症後早期に治療が開始できた症例と比較して、適切な治療の開始が遅れた場合には臨床効果が劣ることも知られている²⁾。

IA の治療成功の鍵は適切な治療の早期開始にある。しかし、深在性真菌症発症のリスク因子を有する患者すべてに闇雲に抗真菌薬を投与することは、医療経済性、有害事象発症のリスク、抗真菌薬耐性化などの観点から慎まなければならない。正確な診断に基づいた過不足のない抗真菌療法が望まれる。

本項では IA の診断法について、実地臨床の立場から解説する。

2. IA 確定診断の難しさ

本症の症状は非特異的である。したがって、基礎疾患などのリスク因子を考慮のうえ、必要に応じて深在性真菌症を疑い、積極的に診断へのアプローチを行う姿勢が重要となる。

病巣から直接無菌的に採取した検体で、病理学的、真菌学的に原因真菌を確認することで本症の診断は確定する。しかし、好中球減少や易出血性など、宿主の基礎疾患の特殊性や病態の複雑さなどから侵襲的な検査を積極的に施行することが困難な症例も多い³⁾。感染症の確定診断を行ううえで、血液培養も重要な検査手技である。しかし、IA では血液培養陽性率はきわめて低い。また培養にも長時間を要することなど大きな臨床的限界がある。

IA の早期診断のためには、真菌学的、病理学的な古典

的検査法のみならず、画像診断、血清学的診断法、遺伝子診断法などを組み合わせて総合的に判断する高い臨床力が求められる。

3. IA の診断

好中球減少、免疫抑制薬投与、造血幹細胞移植後など、高度の免疫抑制宿主に広域抗菌薬不応性の発熱を認める場合に本症の合併を考える。他に咳嗽、喀痰、血痰・咯血、呼吸困難などの症状を伴うことが多い。ここでは日常診療で IA の臨床診断に使用されている補助診断法について概説する。

(1) 画像診断

IA を疑ううえで胸部画像はきわめて重要である。特に胸部 CT の有用性を論じた報告は多い。

結節陰影の周囲に淡いスリガラス陰影を認める halo sign は、本症の早期診断に有用な所見として広く知られている。比較的古い論文で Kuhlman ら⁴⁾ は、成人急性白血病患者 10 例のうち、9 例で初期胸部 CT が施行され、8 例で halo sign を認めたと報告し、この所見の有用性を論じている。また、Caillot ら⁵⁾ は血液疾患の患者で胸部 X 線写真上浸潤影を認める発熱性好中球減少症の患者に CT を施行したところ 92% で halo sign を認めたとし、早期診断に有用であったと述べている。また、Caillot ら⁶⁾ は別の論文でも IA 確定診断の得られた血液悪性腫瘍患者 25 例において、発症早期に施行した CT で 24 例に halo sign を認めたと報告している。同様の報告は多く、好中球減少患者で侵襲性アスペルギルス症を疑う場合、halo sign は重要な臨床マーカーとして使用されている。ただし、halo sign は本症に特異的に認められる所見ではなく、他の真菌感染症、ウイルス感染症やウェグナー肉芽腫症、悪性肺腫瘍などでも認められる⁷⁾。また、好中球数の保たれた症例では、halo sign が認められにくい³⁾ ことも知られているので、画像の評価には注意を要する。

一方、air-crescent sign は、肺内の結節や浸潤影の中に三日月状の空隙を認めるものである。侵襲性アスペルギルス発症早期には出現しないが、14 日目には 63% で認めたとする報告⁶⁾ がある。air-crescent sign は早期診断には無力である。しかし、好中球回復期にみられる

所見として重要であり、糸状菌による感染症を示唆するサインとされる⁶⁾。

(2) ガラクトマンナン (GM) 抗原

Aspergillus fumigatus の GM の D-ガラクトフラノース残基、すなわちマンナン主鎖に結合した (1 → 5)- β -D-ガラクトフラノシド側鎖を認識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、ELISA で GM 抗原を検出する。プラテリア アスペルギルスの商品名で発売され国内の日常診療でも広く用いられている。EORTC/MSG (European organization for Research and Treatment of Cancer / Mycosis Study Group) の侵襲性真菌感染症診断ガイドライン⁸⁾で、microbiological criteria の indirect tests に挙げられ、血清または血漿中、あるいは気管支肺泡洗浄液 (BALF)、髄液中の GM 抗原を測定するよう推奨されている。

Pfeiffer ら⁹⁾ のメタ解析の結果では、血中 GM 抗原測定の感度 89%、特異度 71% と比較的良好な成績が示されている。他の臨床検討成績でも高い感度・特異度が報告されており、GM 抗原は現時点で侵襲性アスペルギルス症の診断法として最も信頼性の高い検査法¹⁰⁾ であるといえる。特に本症発症のハイリスク症例において、GM 抗原を経時的にモニタリングし、週に 1~2 回程度インデックス値の推移を評価することは早期診断に有用性が高い³⁾。ただし、抗アスペルギルス活性を有する抗真菌薬が使用されている場合、GM 抗原の感度が低下することが知られているので注意を要する¹¹⁾。一方で、限られた症例数ではあるものの、抗真菌薬の予防投与あるいは経験的治療中でも 79% の感度で、ブレークスルー IA の診断に有用であったとする論文¹²⁾ もあり、今後の詳細な検討が待たれる。他方、呼吸器内科領域で診療する慢性肺アスペルギルス症の診断においては、感度・特異度ともに劣り、その有用性は限られる。

Table 1¹³⁾ に示したように GM 抗原測定における偽陽性因子の報告もあるので注意を要する。国内のピペラリン製剤は GM をほとんど含有しないロッドのみを使用して製造されているので、偽陽性の要因とならないことが判明している。

他方近年、肺泡洗浄液 (BALF) 中の GM 抗原を IPA の診断に応用しようとする研究も進んでいる。Meersseman ら¹⁴⁾ は ICU に入室中の患者 110 例を対象に BALF 中 GM 抗原を測定し、COI 値 0.5 を基準値として、感度 88%、特異度 87% の成績を示している。血清中 GM 抗原の感度は 42% と報告しており、BALF での GM 抗原測定の有用性を論じている。また、Becker ら¹⁵⁾ は CT ガイド下で BAL を行い、COI 値 1.0 を基準値とした場合、BALF 中 GM 抗原は感度、特異度、PPV、NPV とともに 100% と報告している。Maertens ら¹⁶⁾ も同様に、血液疾患の患者において BALF 中 GM 抗原を測定し、ROC 曲線の AUC を 0.93 と報告している。

IA の早期診断において BALF 中 GM 抗原の測定を有用と評価する論文は多い。ただし、後ろ向き検討の結果

Table 1. ガラクトマンナン抗原測定に影響を及ぼす因子

偽陽性	感度低下
PIPC / TAZ 投与	抗真菌薬予防投与
AMPC / CVA 投与	
<i>Bifidobacterium</i> spp. の腸管内定着	
<i>C. neoformans</i> galactoxylomannan	
大豆蛋白を含む経管栄養	

文献 13) より引用・改編

もあり、BALF を採取する際の手技は統一されていない。また、IA 感染巣の部位により BALF の回収率に大きな違いが生じるので、GM 抗原測定値には少なからず誤差が生じる可能性もあると思われる。早期診断が困難な IA においては一定の有用性があると考えられるが、さらに詳細な臨床研究が望まれる。

(3) (1 → 3)- β -D-グルカン

(1 → 3)- β -D-グルカン (β -D-グルカン) は、アスペルギルスやカンジダなど多くの病原真菌細胞壁の主要な構成成分である。したがってアスペルギルス症以外の侵襲性真菌感染症でも上昇する。ただし、クリプトコックスと接合菌による感染症では上昇しないことが知られている。一方、アスペルギルス症であってもアスペルギローマや慢性進行性肺アスペルギルス症などのような強い侵襲性病変を形成しない病態では通常、 β -D-グルカンは上昇しない。

β -D-グルカン測定法はわが国で開発された血清診断法であり、国内では広く用いられてきたが、これまで欧米での評価は高いとはいえなかった。しかし 2008 年、EORTC/MSG の診断ガイドライン⁸⁾ クリプトコックスと接合菌以外の侵襲性真菌症診断の microbiological criteria に採用され、また米国感染症学会のアスペルギルス症治療のガイドライン¹⁾ にも β -グルカン測定が紹介されている。

1995 年、最初の β -グルカン測定キット、ファンギテック[®] G テストがわが国で開発された。その後、いくつかのキットが商品化されたが、現在国内ではファンギテック[®] G テスト MK-II ニススイ (MK-II)、 β -グルカンテストワコー (ワコー法) の 2 種類のキットを使用可能である。また、米国ではファンギテルが臨床応用されており、計 3 つの測定キットがある。いずれも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を用いている。しかし、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おり (Table 2)、MK-II 法は 20pg/ml、ワコー法は 11pg/ml、ファンギテルでは 80pg/ml の基準値が採用されている。MK-II は 2012 年に、それまでのファンギテック[®] G テスト MK (MK) の後継キットとして臨床現場に導入されたもの¹⁷⁾ であり、感度・特異度に関する臨床検討の成績はまだないが、MK と同様の成績が得られるものと推測される¹⁸⁾。

Table 2. β -グルカン測定 3 キットの仕様

	MK- II	ワコー法	ファンジテル
承認国	日本	日本	米国 (FDA)
承認年	2012 年	1996 年	2004 年
測定原理	カイネティック比色法	カイネティック比濁法	カイネティック比色法
検体	血漿・血清	血漿・血清	血清
検体前処理	アルカリ法	希釈加熱法	アルカリ法
標準品	パキマン	カードラン	パキマン
主剤原料	<i>Limulus polyphemus</i>	<i>Limulus polyphemus</i>	<i>Limulus polyphemus</i>
カットオフ値	20pg/ml	11pg/ml	80pg/ml
測定範囲	3.9pg/ml	6pg/ml	31.25pg/ml

Table 3. 各 β -グルカン測定キットの性能比較

	感 度	特異度	PPV	NPV
MK 法	75.00%	91.60%	52.90%	96.70%
ワコー法	41.70%	98.90%	83.30%	93.10%
マルハ法	41.70%	96.80%	62.50%	92.90%
Fungitell	83.30%	92.60%	58.80%	97.80%

文献 19) より改編・引用

MK, ワコー法, ファンジテルの深在性真菌症診断における私たちの成績¹⁹⁾を示す (Table 3). 各測定キットごとに感度・特異度にばらつきがあるので, 得られた数値の評価は慎重に行うべきである.

Pickering ら²⁰⁾は侵襲性カンジダ症患者と菌血症患者, 健常人を対象にファンジテルの性能を評価し, 感度, 特異度, 陽性予測値, 陰性予測値がそれぞれ, 93.3%, 77.2%, 51.9%, 97.8%であったと報告している. また, GM 抗原陽性検体 32 検体中 31 検体で β -D-グルカン陽性 (≥ 80 pg/ml), GM 抗原陰性検体 32 検体中 9 検体で β -D-グルカン陽性, 22 検体が陰性 (< 60 pg/ml), 1 検体では判定保留 (60-79pg/ml) であったと述べている. さらに Karageorgopoulos ら²¹⁾は β -D-グルカンのメタ解析を行い, 深在性真菌症全体での感度, 特異度は 76.8%, 85.3%, IA では 197 例 152 例 (77%) の陽性率であったと報告している. 一方, Fontana ら²²⁾は血液悪性腫瘍を基礎に有する IA 確定診断例 3 例, IA 臨床診断例 18 例, 侵襲性カンジダ症確定診断例 3 例と深在性真菌症のない患者 22 例の検討で 100%の感度, 特異度を示し, 5 例で GM 抗原よりも早期に陽性化したと報告して, β -D-グルカン測定の IA 診断における有用性を論じている. しかし他方で, 造血幹細胞移植後の患者の IA 診断において, 感度 27.2%, 特異度 94.4%, 陽性予測値 6.2%, 陰性予測値 93.7%であったとする Metan ら²³⁾の報告もある.

β -D-グルカン測定は IA の早期診断において一定の有用性があると考えられる. しかし, β -グルカン値測定はさまざまな要因で偽陽性を生じ得る. これには環境

や医療材料, 薬剤などに含有される β -グルカン汚染による偽陽性と, β -グルカン以外の非特異反応による偽陽性がある. したがって臨床所見や経過に合致しない β -グルカン値が得られた場合には, 採血手技, 検体移送, また宿主の状態や基礎疾患などを考慮して, 得られた β -グルカン値が临床上, 信頼できる数値か否かを吟味する必要がある.

(4) 遺伝子診断

アスペルギルス属に特異的な PCR 法を用いた迅速診断の研究も進められている²⁴⁾. 血液を試料としてアスペルギルスの DNA を検出する PCR 法の研究成果が多く報告され, それぞれに比較的良好な成績が得られているようである. 研究室レベルで多用している施設もあるが, 使用する PCR 法の違いにより, 感度, 特異度にはかなりばらつきがみられるのが現状である. IA 診断のための標準法が確立されていないため, 日常診療では広く使用できない. しかし, 近年では BALF を試料としてアスペルギルスの遺伝子を検出する試み²⁵⁾や血中 GM 抗原測定との組み合わせ²⁶⁾により精度を高めようとする研究が行われている. 今後の臨床研究に期待がかかる診断法である.

4. おわりに

IA 臨床診断について概説した. 侵襲的手技を要しない補助診断法を臨床応用することが可能となり, その有用性を裏付ける試験成績も数多く発表されている. しかし, 本項で紹介した診断法はあくまでも補助的に用いる

べきものであり、真菌学的、病理学的検査法の代替検査となり得るものではない。また、最適な検体は何か、最も効率的に早期診断可能となる検査の間隔、得られた数値の評価など、明らかにしていかなければならない課題は少なくない。

補助診断法の有効性と限界を知って臨床使用する心構えが重要である。

文 献

- Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, Herbrecht R, Kotoyannis DP, Marr KA, Morrison VA, Segal BH, Steinbach WJ, Stevens DA, van Burik JA, Wingard JR, Patterson TF: Treatment of Aspergillosis: Clinical practice guidelines of the infectious diseases society of America. *Clin Infect Dis* **46**: 327-360, 2008.
- Perfect JR: Fungal diagnosis: how do we do it and can we do better? *Curr Med Res Opin* **29**: 3-11, 2013.
- Ostrosky-Zeichner L: Invasive mycosis: Diagnostic challenge. *Am J Med* **125**: S14-S24, 2012.
- Kuhlman JE, Fishman EK, Burch PA, Karp JE, Zerhouni EA, Siegelman SS: Invasive pulmonary aspergillosis in acute leukemia. The contribution of CT to early diagnosis and aggressive management. *Chest* **92**: 95-99, 1987.
- Caillot D, Casasnovas O, Bernard A, Couaillier JF, Durand C, Cuisenier B, Salary E, Piard F, Petrella T, Bonnin A, Couillault G, Dumas M, Guy H: Improved management of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients using early thoracic computed tomographic scan and surgery. *J Clin Oncol* **15**: 139-147, 1997.
- Caillot D, Couaillier JF, Bernard A, Casasnovas O, Denning DW, Mannone L, Lopez J, Couillault G, Piard F, Vagner O, Guy H: Increasing volume and changing characteristic of invasive pulmonary aspergillosis on sequential thoracic computed tomography scans in patients with neutropenia. *J Clin Oncol* **19**: 253-259, 2001.
- Georgiadou SP, Sipsas NV, Marom EM, Kontoyannis DP: The diagnostic value of halo and reversed halo signs for invasive mold infections in compromised hosts. *Clin Infect Dis* **52**: 1144-1155, 2011.
- De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, et al: Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis* **46**: 1813-1821, 2008.
- Pfeiffer CD, Fine JP, Safdar N: Diagnosis of invasive aspergillosis using agalactomannan assay: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* **42**: 1414-1427, 2006.
- 山口英世: IV真菌症の診断法. 病原真菌と真菌症改訂4版 (山口英世), pp.75-107, 南山堂, 東京, 2007.
- 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.
- Hoenigl M, Seeber K, Koidl C, Buzina W, Wölfler A, Duettmann W, Wagner J, Strenger V, Krause R: Sensitivity of galactomannan enzyme immunoassay for diagnosing breakthrough invasive aspergillosis under antifungal prophylaxis and empirical therapy. *Mycoses* **56**: 471-476, 2013.
- 吉田耕一郎: 第2章 深在性真菌症の疫学, 診断法および治療戦略 [2] 診断4 血清診断. 深在性真菌症の診断・治療ガイドライン 2007. (深在性真菌症のガイドライン作成委員会 編), pp.45-48 協和企画, 東京, 2007.
- Meersseman W, Lagrou K, Maertens J, Wilmer A, Hermans G, Vanderschueren S, Spriet I, Verbeken E, Van Wijngaerden E: Galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid: a tool for diagnosing aspergillosis in intensive care unit patients. *Am J Respir Crit Care Med* **177**: 27-34, 2008.
- Becker MJ, Lugtenburg EJ, Cornelissen JJ, Van Der Schee C, Hoogsteden HC, De Marie S: Galactomannan detection in computerized tomography-based broncho-alveolar lavage fluid and serum in hematological patients at risk for invasive pulmonary aspergillosis. *Br J Haematol* **121**: 448-457, 2003.
- Maertens J, Maertens V, Theunissen K, Meersseman W, Meersseman P, Meers S, Verbeken E, Verhoef G, Van Eldere J, Lagrou K: Bronchoalveolar lavage fluid galactomannan for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematologic diseases. *Clin Infect Dis* **49**: 1688-1693, 2009.
- 吉田耕一郎, 二木芳人, 松林 直, 山崎智之: アメリカ産カプトガニ原料を用いた (1 → 3) -β-D-グルカン測定試薬ファンギテック G テスト MK II 「ニッスイ」の基礎的評価. 医学と薬学 **67**: 895-902, 2012.
- 松林 直, 山崎智之: 2種の (1 → 3) -β-D-グルカン測定試薬の真菌に対する反応性の比較. 生物試料分析 **35**: 329-335, 2012.
- Yoshida K, Shoji H, Takuma T, Niki Y: Clinical viability of Fungitell, a new (1 → 3) -β-D-glucan measurement kit, for diagnosis of invasive fungal infection, and comparison with other kits available in Japan. *J Infect Chemother* **17**: 473-477, 2011.
- Pickering JW, Sant HW, Bowles CA, Roberts WL, Woods GL: Evaluation of a (1-3) -β-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. *J Clin Microbiol* **43**: 5957-5962, 2005.
- Karageorgopoulos DE, Vouloumanou EV, Ntziora F, Michalopoulos A, Rafailidis PI, Falagas ME: β-D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: A meta-analysis. *Clin Infect Dis* **52**: 750-770, 2011.
- Fontana C, Gaziano R, Favaro M, Casalnuovo I, Pistoia E, Di Francesco P: (1-3) -β-D-Glucan vs Galactomannan Antigen in Diagnosing Invasive Fungal Infections (IFIs). *Open Microbiol J* **6**: 70-73, 2012.
- Metan G, Koç AN, Kaynar LG, Atalay A, Oztürk A, Eser B, Cetin M: What is the role of the (1 → 3) -β-D-

- glucan assay in the screening of patients undergoing autologous haematopoietic stem-cell transplantation? *Mycoses* **56**: 34-38, 2013.
- 24) Segal BH, Walsh TJ: Current approaches to diagnosis and treatment of invasive aspergillosis. *Am J Respir Crit Care Med* **173**: 707-717, 2006.
 - 25) Kawazu M, Kanda Y, Goyama S, Takeshita M, Nannya Y, Niino M, Komeno Y, Nakamoto T, Kurokawa M, Tsujino S, Ogawa S, Aoki K, Chiba S, Motokura T, Ohishi N, Hirai H: Rapid diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis by quantitative polymerase chain reaction using bronchial lavage fluid. *Am J Hematol* **72**: 27-30, 2003.
 - 26) Rogers TR, Morton CO, Springer J, Conneally E, Heinz W, Kenny C, Frost S, Einsele H, Loeffler J: Combined real-time PCR and galactomannan surveillance improves diagnosis of invasive aspergillosis in high risk patients with haematological malignancies. *Br J Haematol* **161**: 517-524, 2013.