

4. アゾール系抗真菌薬：(1) RO0094815
及びプロドラッグRO0098557

アゾール系合成抗真菌薬は、平成 12 年度報告書に記述したように、国内においては全身投与型のミコナゾール（活性中心はイミダゾール環、フェニル環は塩素原子で置換）、イトラコナゾール（トリアゾール環、塩素置換）及びフルコナゾール（トリアゾール環、フッ素置換）の 3 種があり、それ以外のケトコナゾールなど 11 種の薬剤は全て外用剤であって、その活性中心はイミダゾール環、フェニル環は無置換であるか、アルキル鎖もしくは塩素で置換されている。

全身投与型のフルコナゾールの有用性に着眼して、世界の製薬企業各社が新規アゾール系抗真菌薬の開発研究に取り組んできており、平成 12 年度報告書において 8 種の開発候補品目を記述したが、Voriconazole は 2002 年にアメリカにおいて承認されており、その添付文書には以下のような用法・用量と副作用の記載がある。

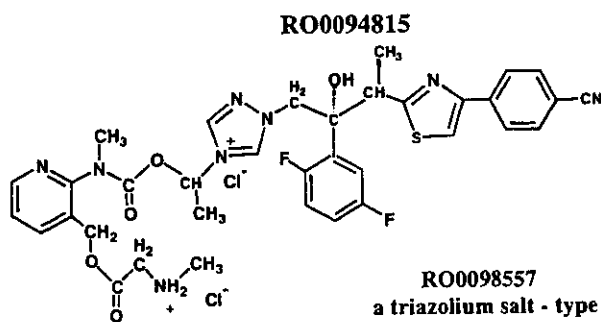
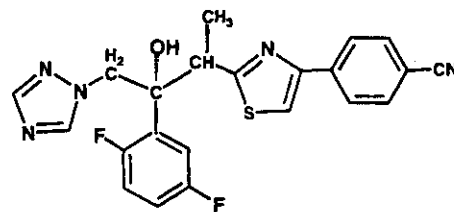
IV (infusion) Age ≥18		
Loading	6mg/kg q12h	
Maintenance	4mg/kg q12h	
Increase of dose	none	
PO (50mg / 200mg Tablet)		
BW	≥40kg	<40kg
Loading	none	none
Maintenance	200mg q12h	100mg q12h
Increase of dose	300mg q12h	150mg q12h

Adverse reactions: visual disturbance, fever, rash etc.

Special cautions: hepatic / renal-insufficiency, the elderly

アメリカにおける Voriconazole の承認適応は、Invasive aspergillosis 及び重篤な *Fusarium* spp 又は *Scedosporium apiospemum* 感染症とされており、国内で考えられるようなフルコナゾール耐性のカンジダ症に対する適応は承認されておらず、添付文書には *Candida* の文字は、1カ所も記載されていない。当該製薬企業の研究者から、そこに、アメリカ FDA の頑ななポリシーが有ることを教えられたが、*Candida* 感染症に関しては既存のフルコナゾールの経口剤及び注射剤又はケトコナゾールの経口剤で十分に対応できるので、Caspofungin や Voriconazole のような新規の抗真菌薬は、既存の薬剤が無効である Aspergillosis などの適応に限定するというものであり、同様な考え方はイトラコナゾールの承認適応を見れば分るということであった。

今回の ICAAC において新発表されたアゾール系抗真菌薬は、日本ロシュ社からの 2 品目と、インドの Ranbaxy Research 社からの一連の 3 品目だけであった。



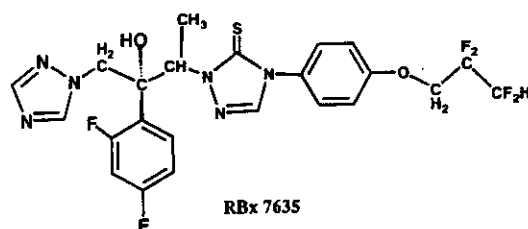
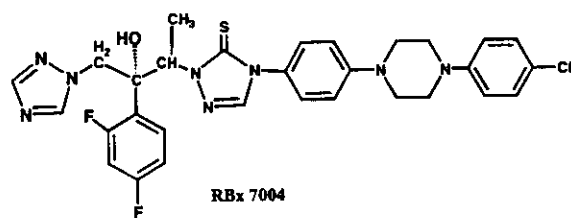
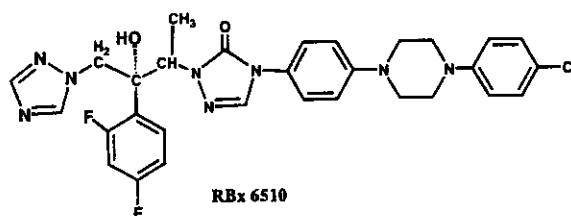
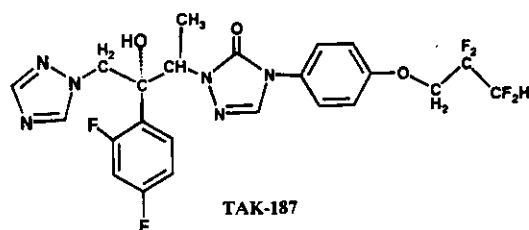
日本ロシュ社の RO0094815 は、現在アメリカで Bristol-Myers Squibb 社が開発中である Ravuconazole (BMY-207147; エーザイ社の ER-30346 を導入) のフェニル環の 2 分子のフッ素置換位置がオルト・パラからオルト・メタに変換されている化合物である。発表内容は、(1) ドラッグ・デザイン、合成、プロドラッグの安定性と体内での活性本体の解離、(2) RO0094815 の *Candida* 属 各種 菌株 と *Aspergillus fumigatus* に対する試験管内抗真菌活性、そのプロドラッグである RO0098557 を用いての経口及び静注によるフルコナゾール耐性 *C.albicans* 感染モデルにおける *in vivo* 検討及びサルにおける薬物動態検討成績であった。その特徴として、広域な抗真菌活性、1g/mL 以上の高い水溶性、87% という優れたバイオアベイラビリティ、静注で 9.8 時間及び経口で 12.8 時間という長い血中濃度半減期から予測できる 1 日 1 回投与の可能性などが挙げられていた。本プロドラッグは、現在スイスの Basilea 社で開発を検討中とのことである。残念なことに、最も興味もたれる Ravuconazole との抗真菌活性の比較は発表されておらず、フッ素の置換位置による活性の変化は知ることができなかった。

5. アゾール系抗真菌薬：(2) RBx 6510 及びチオトリアゾロン誘導体 RBx 7004 及び RBx 7635

インドの製薬企業は従来より化学合成を得意としており、抗菌薬の分野ではフルオロキノロン系やオキサゾリジノン系の領域において、旺盛な研究開発を推し進めてお

り、近年の ICAAC においても、多数の新規化合物を発表している。

今回発表された Rambaxy Research 社の一連の化合物は、武田薬品が 1996 年に発表した TAK-187 をモデル化合物として、各種の誘導体を合成し、評価を行っている。



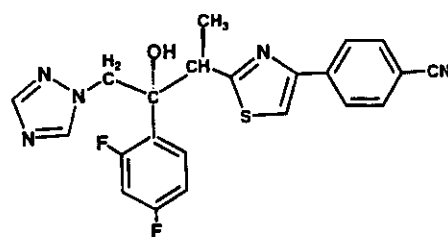
その構造-活性相関は興味深いものであり、TAK-187 (*Aspergillus fumigatus* に対する MIC₉₀ = 8 μg/ml) のトリアゾロンの右の側鎖を変換した RBx 6510 は MIC₉₀ が 0.03 μg/ml と抗真菌活性が著しく強化され

ており、側鎖はそのまま、トリアゾロン環をチオトリアゾロン環に変換した誘導体 RBx 7635 は MIC₉₀ が 0.5 μg/ml と強化されている。それらの2つの修飾を併せて加えた RBx 7004 の MIC₉₀ は中間的な活性であり 0.12 μg/ml となっている。その他の *Aspergillus* 属の菌種及び *Rizopus* 属の菌種や *Mucor* 属の菌種に対しても RBx 7004 が優れた活性を示すが、*Candida albicans* に対しては著しく活性が低いことから、その後の評価は、酵母状の *Candida albicans* 及び *Cryptococcus neoformans*、並びに糸状の *Aspergillus fumigatus* に対して平均的に優れた活性を示す RBx 7635 に関して行われた。マウスの致死的なモデルにおいて、RBx 7635 はフルコナゾールに耐性の *C. albicans* 感染 14 日後における経口単回投与での ED₅₀ は 2.86mg/kg であり、*A. fumigatus* 感染 14 日後においては、1日2回5日間の経口投与で ED₅₀ は 6.25mg/kg であって、対照のイトラコナゾールの3倍程度の効果が認められた

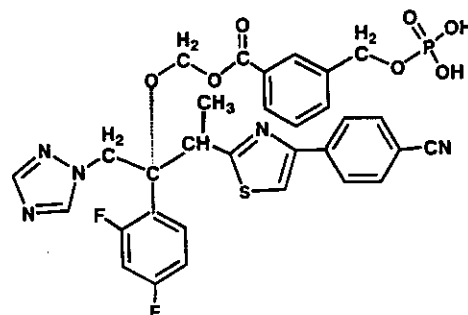
6. アゾール系抗真菌薬：(3) 溶解性が改善された Ravuconazole プロドラッグ BMS-379224

Ravuconazole は既存のトリアゾール系抗真菌薬の中で、*Candida albicans* に対する活性が最も強く (MIC₉₀ = 0.03 μg/ml)、*Aspergillus* spp. に対しても良好な活性 (MIC₉₀ = 1 μg/ml) を示すことが評価されて、1993年のICAACでエーザイが発表した後、1996年に Bristol-Myers Squibb 社が導入して世界規模の開発を行っており、安全性評価が完了して現在は臨床第2相の

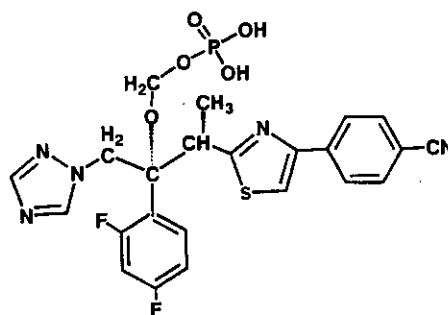
段階にある。その第1相試験において、1日1回400mgの投与で口腔 candidasis などの治療に十分な血中濃度が得られることが確認されたが、aspergillosis などの重篤な全身性の真菌症に対しては、水溶性が高いプロドラッグの投与により、一層高い血中濃度が得ることが必要であり、各種誘導体の中から BMS-292655 を選択して、その評価を行っている。



Ravuconazole
(ER-30346/BMS-207147)



Ravuconazole Prodrug
BMS-292655
(phosphonobenzoate acetal)



Ravuconazole Prodrug
BMS-379224
(phosphonoxymethyl ether)

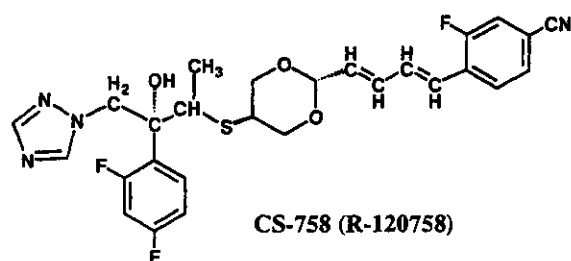
プロドラッグのデザインとして、溶液中及び生体内安定性を考慮して、当初はアルカリ性ホスファターゼとエステラーゼの2段階の加水分解を経て活性本体が遊離するBMY292655を得て、安定性と本体遊離のカイネティクス、ラット・イヌ・サルでの体内動態、マウスにおける全身性カンジダ感染モデルでの治療効果の評価を行い、予期した成績が得られた。BMY292655はマウスに90mg/kgを静注で14日間連続投与して、投与部位に僅かな刺激がある以外には、特に留意するような副作用は認められず、安全性が確認された。そのような評価を進めている間に、ベンゾエートのスペーサーを含まないBMY379224が合成され、その評価を行ったところ、BMY292655の特徴を全て備えていることが確かめられ、分子量が小さいことも重要な判断のファクターとされて、その後の開発研究はBMY379224に切り替えられている。

BMY379224はpH 7.0における水溶性が>30mg/mLであり、水溶液を室温に13日間放置して、Ravuconazoleは1%以下であった。原薬はリジン塩の結晶であり、極めて安定である。サルに4mg/kg（活性体のRavuconazoleに換算して2.75mg/kg）を5分間掛けて注入するとき、活性体のC_{max}は2.48 μg/mlであり、BMY379224のT_{1/2}は0.06hrであるが、活性体が血漿中に出現するT_{1/2}は7.4hrであった。AUC_{0-24hr}で見ると、BMY379224はRavuconazoleの1.35倍程度であり、プロドラッグとしての徐放性が付与されており、持続性が改善されている。静注投与のBMY379224と経口投与のRavuconazoleは、マウスに同量を投与すると2時間以後の血清中濃度は同等であるが、

得られる最高血清中濃度は5倍程度の相違があり、初期治療にはプロドラッグを静注で投与し、維持にはRavuconazoleを経口投与するという治療法が可能であることが示された。なお、BMY379224は*in vitro*では極めて弱い抗真菌活性しか示さないが、*C. albicans* 及び *A.fumigatus* に対してBMY379224とRavuconazoleは相乗的な効果が認められ、拮抗は認められなかった。

7. アゾール系抗真菌薬：(4) CS-758 (R-120758)

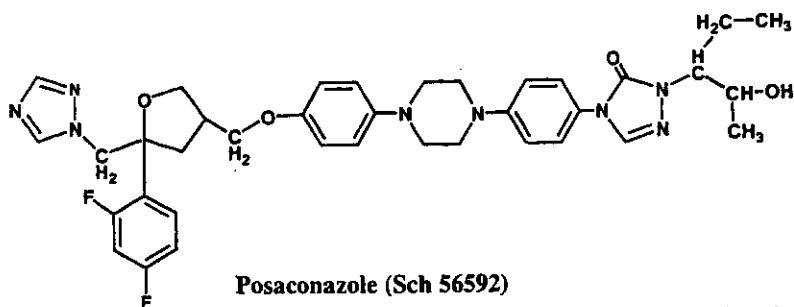
2000年のICAACで初発表のR-120758には、CS-758の開発番号が付され、詳細な前臨床検討が行われている。



今回のICAACにおいては、*Cryptococcus neoformans*のマウス全身感染モデル及び肺感染モデルにおける生菌数減少効果と、致死的モデルにおける治療効果の検討成績を発表した。後者のモデルにおいては、効果の裏付けとなる薬物動態的な検討も行われている。全身感染モデルにおいて、本薬はフルコナゾールと同程度の脳内の菌数減少効果を示し、Voriconazole及びイトラコナゾールに比して有為に優れていた。肺感染モデルでは、本薬のみが有為な効果を示したが、対照のVoriconazole、フルコナゾール及びイトラコナゾールでは効果は認め

られなかった。致死モデルにおいては、本薬及びフルコナゾールの10mg/kgを経口で1日1回、7日間の治療を行っているが、本薬投与群の生存率は33.3%であり、フルコナゾール群の25.1%に比して有為に優れていた。薬物動態の検討では、本薬投与2時間後の肺組織内濃度は1.8 $\mu\text{g}/\text{mg}$ に達しており、血清中濃度の3~5倍であった。

8. アゾール系抗真菌薬：(5) Posaconazole (SCH56592)



Posaconazoleは1995年のICAACにおいて発表されて以来、極めて広範な検討が行われてきており、現在、臨床第3相の段階である。イトラコナゾールと同様に、分子量が比較的大きく、水溶性が低いので注射剤として用いるためのプロドラッグの検討なども進められている。

既に多数の発表がなされているが、今回のICAACにおいては微生物学的な検討が8演題、in vivoでの併用や薬力学的検討 (pharmacodynamics) が5演題、健常成人における第1相試験、シメチジンとの相互作用の検討、薬物代謝酵素CYP450への影響などが5演題発表されており、本薬の*Aspergillus*属に対する優れた効果を裏付けることにより、FDAからの承認取得に向けて進展していると思われた。

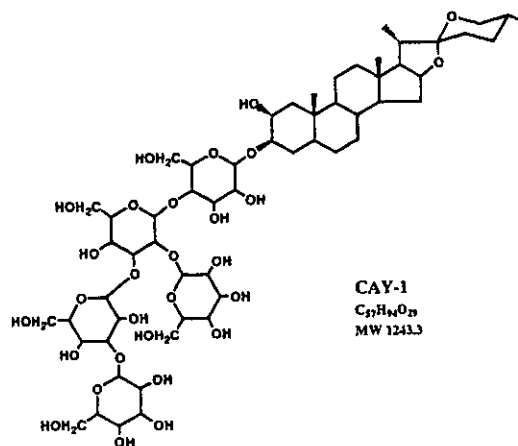
9. その他の抗真菌薬：(1) 植物由来サポニンCAY-1

2000年のICAACにおいて、アメリカ農務省 (USDA) 南部研究所から発表された天然物であり、*Capsicum* spp. (トウガラシ) の果実から抽出される抗真菌性のサポニンである。*Aspergillus*属及び*Pneumocystis carinii*に対して μM レベルで殺抗真菌活性が認められたので、農産物利用の名目で同研究所における研究が進められてきたが、

本物質が10 μM レベルでHeLa細胞に対して細胞毒性を示すことが認められ、国立癌研究所 (NCI) も共同研究に参加した。

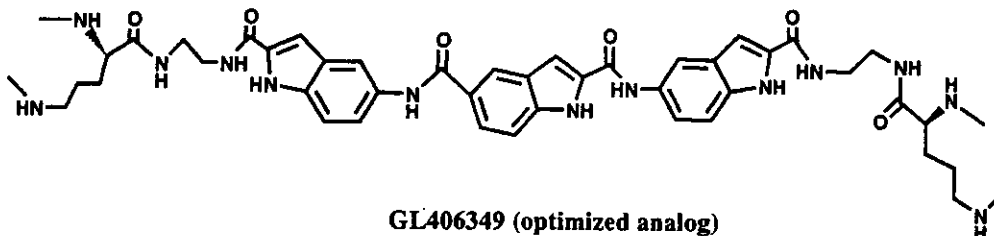
今回のICAACでは、本物質とアムホテリシンB又

はイトラコナゾールとの併用による相乗作用、作用機序が発表されたが、その作用機序は恐らくはエルゴステロールとの相互関係であると推測されている。なお、本物質はグラム陽性菌・陰性菌には全く作用しないので、環境における真菌の選択的除去が可能であるとの論議もなされていた。



10. その他の抗真菌薬：(2) カチオン性ポリヘテロ環状化合物 GL406349

平成13年度の報告書に記述したように、アメリカのバイオベンチャー企業である Genelabs Technologies社では、ゲノム創薬の一環として、真菌のDNA二重螺旋の minor grooveに特異的に結合するカチオン分子の探索研究を進めており、既に幾つかの化合物が得られている。昨年のICAACではGL047296とGL663142の *in vitro* 及び *in vivo* 評価の成績が発表されたが、今回のICAACではGL663142の追加データ及びGL406349に関する発表があった。



本研究の基本的な概念は、天然の抗生物質でカチオン性のポリヘテロ環状化合物である Netropsin や Distamycin の DNA 鎖への結合様式のみミックスであり、化合物の評価においては下記のような合成ヌクレオチド2重鎖との結合体の結晶解析などを行っている。



昨年発表された GL663142 は、*Candida* 属の各菌種及び *Cryptococcus neoformans* に MFC 1~16 µg/ml、*Aspergillus* 属の各菌種に 4~32 µg/mlの活性を示し、フルコナゾール耐性の *C.albicans* 及びフルシトシン耐性の *A.flavus* に対しても MFC 2~8 µg/mlの活性を示し、それらの抗真

菌薬との交差耐性は認められなかった。GL663142 は *C.albicans* に対して、定常期よりも対数期において遥かに優れた活性を示し、その DNA との結合が殺真菌作用を起因していることが裏付けられた。

GL406349 は GL663142 に比較して、*C.albicans* に対する MIC は2倍ほど低くなっているが、短時間での殺真菌力は10倍以上強化されている。現在の段階で得られている化合物の中では GL406349 が最も優れているが、マウスの *C.albicans* 全身感染モデルでの *in vivo* 活性はフルコナゾールより劣っており、今後の一層の誘導体研究が必要であると結論されていた。

11. その他の抗真菌薬：(3) 真菌のグルカン合成酵素阻害剤

アメリカの Pharmacia 社では様々なアプローチからの新規抗真菌薬探索を行っており、その一部は2000年のICAACにおいて、特別セッションであるポスターサマリーの1題として討論された。今回のICAACにおいては、ユニークな真菌グルカン合成酵素阻害剤として2物質が発表されたが、それらの化合物にはコード番号が付されておらず、化学名で表示されている段階であるので、未だ、リード化合物の探索の段階から構造-活性相関の初期の検討段階であるかと思われる。

- (1) *N*-[2-(3,4-dihydro-1H-2-benzopyran-1-yl)ethyl]-*N*-methyl-1-phenyl-4-piperidinamine
- (2) *N*-{2-[(1S)-6-bromo-3,4-dihydro-1H-isochromen-1-yl]ethyl}-1-(4-bromophenyl)-*N*-piperadinamine

これらの化合物は、*Candida albicans*、*Aspergillus fumigatus*、*Candida krusei* から調製したグルカン合成酵素を非拮抗的に阻害する。化合物の評価に際しては特異性に重点を置き、特にキチン合成酵素、トレハロース-6-リン酸合成酵素、細胞膜局在の H⁺-ATPase を阻害しないことに留意した。得られた阻害剤は、パン酵母の核酸合成及びタンパク合成を阻害しない。それら阻害剤のパン酵母への作用をマイクロアレイ法で調べると、細胞外包の正常性を保つために必要な遺伝子の幾つかの発現が抑制されていることが確かめられた。

上記(1)の化合物は、リード化合物であり、8種の試験菌のうち*C. krusei*のみに対して MIC 16~128 μg/mlの弱い活性を示すものであるが、そのブロム誘導体には、全ての試験菌種に対して0.25~32 μg/mlの活性を有するものが見いだされている。それらの誘導体は、動物細胞内への透過性に優れているが、細胞毒性はアムホテリシン B及びケトコナゾールより低いことが確認されている。

化合物(2)について *in vitro* の検討成績が報告されたが、その作用発現には培地の pH が影響し、中性域では試験に供した各種の真菌の生育を完全に阻害するが、強酸性・強塩基性条件下では活性は認められず、その理由としては、これらの阻害剤

が真菌表面に結合する反応は液性及び親水性・疎水性のバランスに影響されるためであると考えられており、そのような影響を受けにくい誘導体の探索研究が続けられている。

12. その他の抗真菌薬：(4) ピリミジン誘導体 V-253

アメリカ Wayne 大学では、10年ほど前よりコンビケム的手法を用いて、抗真菌活性を有する多様な化合物を合成して、それらの *in vitro* 活性を報告してきているが、今回の ICAAC では、arylideneimino-1,3-pyrimidine の各種誘導体を発表した。そのうちで、最も優れた活性を示す V-253 は、MIC₅₀ でみると、*C. albicans* 64 μg/ml、*C. glabrata* 32 μg/ml、*C. parapsilosis* 2 μg/ml、*C. krusei* 16 μg/ml、*Mucor* spp. 4 μg/ml、*Aspergillus* spp. 64 μg/mlであった。いまだ、構造-活性相関の検討段階であり、その作用機序なども検討されていないが、新しい骨格を有する抗真菌薬の探索研究において、一応の結果が得られていると評価されている。

13. その他の抗真菌薬：(5) 抗癌性物質 Dolastatin 10 誘導体 Auristatin PHE

アメリカ Arizona 大学の癌研究所から報告された Auristatin PHE (dovaline-valine-doisoleucin-dolaprorine-phenylalanine-methyl ester) は、現在、抗癌剤として臨床第1相~第2相の評価が行われているが、本物質のマイクロチューブリル形成阻害活性に注目し、*Cryptococcus neoformans*

に対する作用を検討した。本物質は、その MIC 濃度で4.5時間処理すると、マイクロチュブリルは完全に崩壊し、核の移動や核分裂及び細胞分裂が阻害された。mRNA ディスプレイにより、アデニレートシクラーゼの合成の前段階の阻害が確認され、詳細な作用機序の解明の糸口が得られた。

14. その他の抗真菌薬：(6) その他の新規抗真菌薬探索におけるアプローチ

2001年に、真菌 *Aspergillus fumigatus* 及び *Cryptococcus neoformans* の全遺伝子配列が発表され、ゲノム創薬の手法による新規抗真菌薬の探索研究は、一層、活発になってきている。病原真菌に特異的に存在し、ヒトには存在しない遺伝子の発現もしくは遺伝子産物の産生・活性を阻害する新規化合物の探索である。

今までに標的とされてきた遺伝子は、細胞壁合成に関与する *murA*、エルゴステロール生合成経路の *ERG11* や、転写、液胞形成、糖鎖結合に関するものであり、標的特定 (Target identification)、リード化合物特定 (Lead identification) に始まり、標的至適化 (Target optimization) に次いで化合物至適化 (Lead optimization) というゲノム創薬の常法が試みられてきている。

従来は酵母 *Saccharomyces cerevisiae* が実験材料として用いられていたため、病原性に関与する遺伝子産物を標的とする研究は少なかったが、*Candida glabrata*、*Aspergillus fumigatus* や *Cryptococcus neoformans* を材料とする研究も進められ、2000年には *Aspergillus fumigatus* の病原性に関与するパラアミノ安息香酸の合成

をコードする遺伝子 *pabaA* が確認され、その阻害剤の探索研究が行われている。

D. 考察

本研究協力者は、新規抗真菌薬の開発状況を調査するため、2000年、2001年及び2002年の3カ年にわたり、アメリカ微生物学会主催の ICAAC 会議に参加し、同学会において発表された多数の新規抗真菌薬に関する情報を収集した。平成12年度・平成13年度及び本年度の報告書には、それらの新規抗真菌薬の開発の経緯を概説し、本研究班の研究者に情報を提供することにより、各領域の調査研究に協力した。

本研究の遂行中に、アメリカにおいてはエキノカンジン系の Caspofungin 及びトリアゾール系の Voriconazole が承認され、日本ではエキノカンジン系の Micafungin が承認されて、抗真菌化学療法における治療薬の選択肢が拓げられたことは、真菌症患者に対する著しい福音である。

新規抗真菌薬の基礎的・臨床的評価は、材料又は症例が得やすいカンジダ、アスペルギルスに限定されるので、本報告書の中には、本研究班の主要課題である希少真菌種による輸入真菌症などに対する活性や有効性のデータは無い。しかしながら、記述した新規抗真菌薬には、それら希少真菌種に対する潜在的な有効性も期待されるので、耐性真菌症を含む通常の真菌症に対する適応が承認されて、臨床に導入されるならば、世界各地の研究機関により、本研究班の主要課題である希少真菌種による輸入真菌症などに対する活性や有効性の検討成績も蓄積されることと思われる。

「深在性カンジダ症とアスペルギルス症の血清診断の現状と新しい検査法の
開発動向に関する資料文献の収集と論評」

研究協力者 山口 英世 帝京大学医真菌研究センター 教授

研究要旨

深在性真菌症、とくに *Candida* spp. および *Aspergillus* spp. に起因する侵襲性感染は、好中球減少症その他のリスク因子をもつ易感染患者の病態と予後を悪化させる大きな原因となっている。侵襲性病型のカンジダ症やアスペルギルス症の診断は、主として臨床診断および真菌学的検査に依存してきたが、それぞれ特異度および感度の点で限界がある。これを補助する目的で導入された診断法が非培養検査による血清診断と遺伝子診断である。実用化が先行している血清診断においては、病原真菌特異的な抗原、抗体、代謝物、または細胞壁成分の検出を基本原理し、これらの診断マーカーを高感度に検出するシステムが要求される。こうした検査法の幾つかはすでに製品化されて日常検査に使用されている。しかしいずれの検査法も感度および（または）特異度に限界があり、より信頼性の高い検査法の実用化を目指して新しい診断マーカーの探索や高感度検出法の開発が進められている。

本研究においては、わが国の深在性真菌症のなかでも発生頻度が圧倒的に高いカンジダ症とアスペルギルス症の血清診断に焦点を合わせ、現行の検査法ならび研究・開発途上にある新しい検査法についての資料文献の収集を行い、主として技術面と臨床面からみた各々の特徴と可能性を展望した。

A. 研究の背景と目的

深在性真菌症（以下真菌症と略す）とりわけ侵襲性または播種性の真菌症は、易感染患者などに突如として発症して急性に進行することから、しばしば病態の重篤化や死亡を招く^{1, 2)}。こうした患者のマネジメントには、適切な抗真菌薬による治療を可及的早期に開始する必要がある、そのためには早期診断が不可欠である。

真菌症診断の第1段階は臨床的診断 (clinical diagnosis) によって担われる。発症を疑わせる局所のおよび（または）全身的臨床症状があらわれ、それに対応して内視鏡所見や画像所見が得られた場合には、直ちに真菌症成立の確認と起原因菌の特定を目的とする検査を実施し、診断の確定に努めなければならない。この第2段階の診

断が検査医学的診断 (laboratory diagnosis)、病原的診断 (pathogenic diagnosis) または微生物学診断 (microbiological diagnosis) とよばれるものであり、血液その他の体液や分泌物の塗抹標本および組織切片の病理標本のうえでの真菌の検出と形態学的同定を行う顕微鏡的検査（それぞれ直接鏡検および病理組織検査とよばれる）ならびに検体の培養による真菌の分離と同定を目的とする検査（培養検査）が以前から標準的な検査法として用いられてきた。しかしこれらの微生物学検査法は検出感度が低く、起原因菌の検出や分離培養が成功しない症例も決して少なくない。実際、血液疾患患者の播種性カンジダ症での通常の血液培養法による *Candida* 検出率は僅か25%程度であり^{3, 4)}、現在最も高感度の血液培養シス

テムとされる二相性培地 (biphasic media) や溶血遠心法 (lytic centrifugation) を使用した場合は、侵襲性カンジダ症確診例における血液培養陽性率は約50%にとどまる⁵⁾。加えて、培養検査の結果を得るには、数日から数週間という長い日時を要する。

この状況を考えると、1日も早い治療開始が必要な侵襲性真菌症が疑われる症例に対しては診断の確定を待つことなく経験的治療

(empiric therapy) または先制攻的 (pre-emptive therapy) とよばれる早期治療が繁用されるのも当然のなりゆきといえよう。しかし (i) 新興病原真菌 (emerging fungal pathogen) と総称される *Trichosporon spp.* や *Eusarium spp.* など従来みられなかった新顔の真菌による感染症すなわち新興真菌感染症 (emerging fungal infection) がますます増加していること、(ii) カンジダ症、アスペルギルス症といった主要な真菌症においては起因菌菌種によって予後や抗真菌薬の種類や使用法がしばしば大きく左右されること^{1, 2)}、(iii) 選択すべき抗真菌薬の数が今後ますます増えて治療法が多様化すること、などの理由から、的確な治療を行うためには感染の初期段階で起因菌を特定することが一層重要になる。

そのための診断的アプローチとして期待されるのが、非培養検査法 (nonculture methods) に基づく診断であり、主として血清学的手法を用いることから血清診断 (serodiagnosis) または免疫診断 (immunodiagnosis) とよばれてきた。さらに近年は真菌特異的代謝物や菌体成分を酵素生化学的に検出する方法および、真菌遺伝子を分子生物学的に検出する方法も開発され、一部はすでに実用化されている。前者は広義の血清診断に含められ、後者は遺伝子診断 (gene diagnosis) として別扱いにされる。

血清診断については、従来からの微生物学的検査と併用することの重要性がますます強く叫ばれ⁶⁾、1990年代に入って血清診断用検査試薬

が国内外で相ついで市販された⁷⁾。このような状況を背景に、最近国内で作定された「深在性真菌症の診断・治療ガイドライン」

8) には血清診断基準も盛り込まれている。

本研究においては、二大真菌症として診断、治療ともに問題の多い深在性カンジダ症とアスペルギルス症に焦点を合わせ、その血清診断用にすでに製品化された検査試薬の特徴と有用性ならびに新しい検査法の研究・開発動向に関する文献的調査を行った。

B. 研究方法

調査対象とする検査法を、深在性カンジダ症およびアスペルギルスの血清診断を目的とするものに限定し、現行の検査法ならびに研究・開発が現在進行中の新しい検査法に関して重要と考えられる文献を、関係専門領域の学術雑誌の検索によって選び出した。そのうえで各文献資料について、内容を吟味し、臨床的有用性についての評価・検討を行った。

C. 研究結果

I 血清診断および検査法に関する基本的概念

患者の血清その他の液性検体 (髄液、BAL液、尿など) から、特定真菌による感染が起こった場合にのみ出現する真菌由来物質または生体反応物質を検出し、それに基づいて行う診断を、一般に血清診断とよんでいる。これはもともとそうした特異的物質の検出に血清学的反応 (抗原抗体反応) が利用されたことに由来する。真菌症の診断は、微生物学的検査に基づくものを基本とし、血清診断はそれを補充する役割をもつに過ぎないとするのが従来の考え方であった。血清診断がしばしば補助診断として扱われるのもそのためである。かつて検討または開発された血清診断用の検査法 (血清診断法) の多くが、微生物

物学的検査法にくらべて信頼性に乏しい（とくに特異度が低い）ことが主たる理由であった。しかし血清診断法の進歩に伴って、真菌症診断における比重は次第に高まりつつある。

1. 診断マーカーとその検出法

検出の標的となる物質すなわち診断マーカーは、特異抗体または特定の真菌成分である。抗体は一旦産生されると比較的長い期間にわたって安定して流血中に存在することから、検体採取にあたってはそのタイミングや患者の病態に配慮することも、頻回実施することも必要ない。したがってアスペルギローマやアレルギー性気管支肺アスペルギルス症 (ABPA) などのように非免疫不全患者に起こる慢性病型の真菌症に関しては、特異抗体のレベルが高いことまたは上昇に向っていることがこれらの疾患を診断する好適な指標となる。その一方、免疫不全患者（易感染患者）に好発する侵襲性真菌症に関しては、抗体価を診断指標とすることには次のような問題点がある。(i) 抗体産生応答は感染後かなり遅れて始まるため、感染初期には抗体が検出されない。(ii) 発症例の大半を占める免疫不全患者では抗体産生能が低下している。(iii) *Candida spp.*などが常在する健常者にも高い抗体価を示す（偽陽性）例が少なくない。侵襲性真菌症を発症した場合にはとりわけ早期診断が必要なことを考えると、(i) や (ii) はとくに大きな欠点となる。

これに対して、真菌の特異的成分を診断マーカーとするならば、上記の問題点は解消するはずであり、そのほかにも次に示す利点がある。(i) 環境中真菌への曝露による影響が少ない。(ii) ことなる真菌間での交叉反応性が低い（反応はより特異的である）。(iii) 活動性感染と過去の感染またはコロナイゼーションとの識別が容易である。(iv) 感染の早期段階（発症前）から検出可能なことが多い。(v) 感染の重症度や治療効果を速やかに反映する。

これらの理由から、現在では真菌成分検出系が侵襲性真菌症に対する血清診断法の主流となっている。しかし真菌成分は、生体内で代謝を受けること、感染の強さや部位によって血清などの検体中の濃度に大きな差があること、血中には一過性にしか出現しない場合が多いこと、などの点では、診断マーカーとして別の問題点をかかえている。実際に診断マーカーとして使用される真菌成分は、細胞表面多糖および細胞質タンパクである場合が多く、したがって血清学的反応を利用すれば、特異抗原として容易に検出することができる。それ以外の検出法としては酵素生化学的方法があり、(1,3) - β -D-グルカンなどの真菌細胞壁成分や、D-アラビニトールといった代謝産物の検出に利用されている。

2. 真菌成分の診断マーカーとしての特異性

診断マーカーとして利用される真菌成分は、当然ながら何らかの真菌感染が起こった場合にのみ特異的に検出されるものでなければならない。しかしその特異性の範囲は次のように広いものから狭いものまで様々であり、目的に応じて使い分けられる。(i) 真菌全般、(ii) 特定の菌群（属）、(iii) 特定の菌種、(iv) 同一菌種内の特定タイプ（血清型など）。

(i) に該当するのは、ヒトを含めて真菌以外のいかなる生物群にも存在しない一方、ほとんどすべての真菌（病原性の有無を問わず）に共通してみられる成分である。その代表例は、接合菌など僅かな例外を除いてすべての真菌の細胞壁共通多糖成分として知られる (1,3) - β -D-グルカンである。したがってこの成分は、診断マーカーというよりむしろ真菌症スクリーニングのマーカーとみなすべきかも知れない。これに対して、(ii) ~ (iv) は、いずれも疾患ごとの血清診断に役立つマーカーとなる。ただし (ii) と (iii) の違いに関連して、カンジダ症とアスペルギルス症の場合には留意すべきことがある。これまで

の両真菌症の血清診断法の研究・開発が、もっぱらそれぞれの最多起因菌種である *Candida albicans* および *Aspergillus fumigatus* を対象にして行われてきたことであり、その意味では (iii) のカテゴリーに属する。しかし実際には *C. albicans* 以外の幾種かの病原性 *Candida* spp. (non-*albicans* *Candida*) または *A. fumigatus* 以外の病原性 *Aspergillus* spp. (non-*fumigatus* *Aspergillus*) も交叉反応性を示すことを考えると、やはり (iii) に含めるのが妥当であろう。近年、

C. tropicalis, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* といった non-*albicans* *Candida* によるカンジダ症や、*A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus* などの non-*fumigatus* *Aspergillus* によるアスペルギルス症が増えており、少なくとも起因菌の属レベルでの診断には、むしろ反応が交叉するほうが好都合かも知れない。しかしその場合でも、菌種ごとに交叉反応性の強さはことなるはずであるから、主要な幾つかの起因菌種については、検出されやすいものとそうでないものとを明確に区別しておく必要がある。残念ながら、現在市販されているいずれの検査試薬とも、この点での検討に乏しいきらいがあり、今後の重要な課題となっている。

3. 診断法としての利点および有用性

カンジダ症およびアスペルギルス症の各々の血清診断に用いられる検査法は幾つも開発されているが、いずれをとってもクリプトコッカス症診断用の *Cryptococcus neoformans* 荚膜多糖抗原検出系にくらべると信頼性は劣るといわざるをえない。しかし一般論としての立場からみると、真菌症診断における血清診断の役割は大きく、次のような利点があげられる。(i) 微生物学的検査で起因菌が検出されない多くの症例を含めてすべての症例に適用可能である。(ii) 真菌の汚染や定着が起こっただけではふつう陽性化しないので、それらの真菌を起因菌と見誤ること

がない。(iii) 検査実施に特別の経験や技術を必要としない。(iv) 迅速に結果が得られる(通常数十分～数時間)。(v) 検査自動化が容易である。

また診断ばかりでなく、病勢の推移または治療効果のモニタリング、治療の臨床的エンドポイントとの決定などにも利用できる利点がある。さらには新規抗真菌薬の臨床試験などにおいて患者組み入れのためのサロゲートマーカー (surrogate marker) としても役立つ。

II 主な現行血清診断法の研究・開発の経緯と特徴

近年、真菌症血清診断への期待が高まったことを受けて、その検査法に関する基礎的ならびに応用的研究はめざましい進展を遂げつつある。これを可能にしたのは、次のような様々な面での学問的解明もしくは技術的進歩があったからにほかならない。(i) 真菌細胞とくに細胞壁の構造(したがって主要構成成分の抗原としての特異性および交叉反応性)、(ii) 真菌菌体成分または代謝物と生体免疫系との相互作用、(iii) 抗原の発育依存的産生(例、*C. albicans* のエノラーゼ抗原、*A. fumigatus* のガラクトマンナン抗原)および生体内での修飾(*C. albicans* の Cand-Tec 抗原)、(iv) 単クローン抗体作製法、(v) 各種酵素免疫法(とくに ELISA 法)やイムノプロット法などを利用した高感度検出法。

1. カンジダ症の血清診断法

カンジダ症の血清診断を目的として、これまで多種多様な検査法の研究・開発がなされてきた。それを検査マーカーおよび検出法に基づいて整理すると、次の3つのカテゴリーに大別される。(i) *Candida* 抗原に対する抗体の検出系、(ii) *Candida* 成分の免疫学的検出系 (*Candida* 抗原検出系)、(iii) *Candida* 成分の酵素生化学的検出系。

a. 抗*Candida*抗体検出系

侵襲性カンジダ症の診断マーカーとしての抗 *Candida* 特異抗体の研究は、他の診断マーカーに

先行して、すでに1960年代から広く行われてきた9~13)。最初に開発されたのは沈降反応または受身血球凝集反応 (PHA) を利用した検出法であった。当初、抗原には *C. albicans* の細胞壁および細胞質成分を含む粗標品が使われたが、やがて生化学的、血清学的に特性の明らかな精製抗原が利用されるようになった。なかでも強い免疫原性と高い特異性をもつ細胞壁マンナン抗原がとくに注目され、抗マンナン抗体検出系の開発に研究が集中した9~14)。その結果、欧米では一時期、抗マンナン抗体検出試薬が幾つか製品化された15、16)。しかし抗マンナン抗体が健康者や表在性カンジダ症患者からも高率に検出されること、有意な抗体レベルに達するまでかなりの日時を要すること、免疫不全患者では抗体産生応答能が低下していること17、18)、などの理由から、現在ほとんど利用されていないようである。この検査が有用と考えられる唯一の病型は、カンジダ性心内膜炎であり、この場合には抗体価が著しく上昇し、診断的意義があるとされている19)。侵襲性カンジダ症についていえば、抗体産生応答は診断よりもむしろ予後の判定に役立つ指標となる。良好な抗体産生応答すなわち抗体価の上昇は病態改善または回復を、一方、抗体産生の欠如は予後の不良を示唆する。

マンナンを含まない *Candida* 成分の幾つかについても、抗体産生応答の検討がなされてきた18、20-22)。40~60kDaのサイズをもつ種々のタンパク抗原に対する抗体などが侵襲性カンジダ症患者の血清中に見出されることが知られているが、詳しい検討はなされていない。

b. *Candida* 抗原検出系

1980年代中頃から、イムノブロット法が侵襲性カンジダ症患者の抗体産生応答の解析に導入され、様々な主要抗原決定基をもつ *Candida* 抗原が特定され、診断マーカーの候補としての検討

がはじまった。そのなかの代表的なものが次の4つである。(i) カンジテック抗原 (Cand-Tec antigen), (ii) マンナン抗原、(iii) エノラーゼ、(iv) Hsp 90。これらの抗原と各検出法の概略は幾つかの総説23-31) に詳しい。現在国内で市販されている検査試薬は、いずれも (i) または (ii) を標的とするものに限られている。

(1) カンジ・テック抗原

Gentry et al³²⁾ によって開発された「カンジ・テック® (Cand-Tec®)」は、世界最初のカンジダ症診断用検査試薬として、欧米では1980年代半ばから、わが国では1990年代初めに市販された。この試薬は、*C. albicans* 加熱死菌を注射して免疫したウサギのポリクローン抗体で感作したラテックス粒子であり、逆受身ラテックス凝集反応によって血清中の *Candida* 抗原を検出する。標的となる抗原 (カンジ・テック抗原) の本体は完全には明らかにされていないが、57℃で失活し、マンナンを含むタンパク性の物質と考えられる。カンジ・テック抗原は、奇妙なことに *C. albicans* の培養上清中には見出されず³³⁾、おそらく本菌の何らかの成分が生体内で修飾を受けて生じたものと推測されていた。その後、この抗原は少量の *Candida* マンナンと補体第3成分を含む分子サイズ4,000-kDa以上という巨大なタンパク性複合物質であることが示されている³⁴⁾。

「カンジ・テック®」検査の臨床評価試験はこれまで多数の研究グループによって行われ、感度、特異度のいずれについても様々な成績が得られている15、32、36-45)。それをみると、感度は33%から77%まで、また特異度は29%から88%までといずれも報告によって著しい相違がある。このような成績のばらつきは、評価試験のデザイン、被験対象患者集団、検体採取頻度、デシジョン・レベル (カット・オフ値)、起因菌種などの違いによると考えられる36-39)。

Burnie⁴⁶⁾ は、好中球減少患者よりも侵襲性カンジダ症を発症した術後患者を対象にして評価した場合のほうが、Candidaコロナイゼーションと全身感染とをより明確に識別できると述べている。その理由としては、(i) 好中球減少患者はIgGを上回るIgM産生を示すことが多いため、遊離抗原量が少なくなる可能性があること¹⁸⁾、(ii) 抗原として検出されるためには、白血球による処理を介して修飾を受ける必要があること¹⁶⁾、などが考えられる。またカットオフ値については、キットの添付文書にも記されているように、4倍希釈 (1:4) 以上の値を陽性とするのがふつうであるが、わが国などでは1:2以上とする場合もある。一般に、好中球減少患者が侵襲性カンジダ症を発症した例においては、1:4程度の弱い反応性しかみられないようである^{35, 47)}。したがって好中球減少患者については、感度を低下させないためにカットオフ値を低レベルにする必要がある。一方、非好中球減少患者の場合には、むしろ特異度を高める必要性から、より高レベルのカットオフ値 (1:8) を設定すべきであろう。

起因菌種による影響も大きく、とくに C. parapsilosis, C. krusei, C. lusitaniae といった菌種の場合は、「カンジ・テック[®]」では容易に検出できず、したがって偽陰性の結果を与える^{16, 48)}。これに対して、偽陽性反応が Aspergillus spp.¹⁶⁾、⁴¹⁾、⁴⁸⁾ や Cr. neoformans⁴⁰⁾ の感染患者にみられることがある。「カンジ・テック[®]」は感度の低さが最大の欠点とされ、これを補うためひんぱんに (可能ならば毎日) 検査を行うのが望ましいとされている。またカンジ・テック抗原のレベルは、病態が回復するにつれて低下し、再燃とともに上昇するので、治療効果のモニタリングにも利用できる。

結論的にいえば、「カンジ・テック[®]」検査

は、有用性が限定的であるものの、迅速性と簡便性の点ではきわめてすぐれている。したがって適正な利用法— (i) リウマチ因子陽性患者 (偽陽性を呈する) の除外、(ii) 頻回の検査、(iii) 患者が好中球減少か否かを考慮に入れたカットオフ値の設定 — のもとでは、侵襲性カンジダ症の診断とマネジメントに一定の役割を果たすものと考えられる。

(2) マンナン抗原

Candida由来の血中抗原として最初に確認されたのが、細胞壁マンナン (またはマンナンタンパク複合体) である。この抗原の主体をなすマンナンは、D-マンノースのホモ重合体であり (複合体の場合はこれに少量のタンパクとリン酸が加わる)、煮沸、プロテアーゼ、酸性pHなどの処理に対しても抵抗性を示し、高い安定性をもつ。血清中においては、マンナンは免疫複合体をつくっているため、検出に際してはまずプロテアーゼ処理、アルカリ処理、加熱処理などによってマンナンを解離させる必要がある。急性白血病などの易感染患者が侵襲性カンジダ症を発症した場合にマンナン抗原が検出されやすい理由の一つは、抗体産生能 (したがって免疫複合体形成能) の低下にあると推測される^{27, 49)}。

血中からのマンナン抗原の検出には、1970年代後半から酵素免疫法 (EIA法) とくにELISA法をはじめ、放射免疫法 (RIA法)、ラテックス凝集反応法 (LA法) など様々な方法が試みられてきた^{10, 23, 24, 25)}。いずれの検出法も高い特異度を示したものの、感度については報告によって一定せず、例えばLA法では0%から81%まで、EIA法でも23%⁴⁰⁾から90%まで⁴⁸⁾とまちまちの成績であった。おそらく感度には次のような様々な因子が影響を及ぼすものと考えられる。(i) 抗体プローブの品質、(ii) 起因菌の菌種、(iii) 患者の基礎病態、(iv) 血清検体採取 (検査) の頻度とタイミング。

どのようなCandida菌種から由来したマンナン

に対する抗体プローブを使用するかによって、各菌種のマンナンの検出感度は大きく異ってくる。Nakamura et al⁴⁹⁾によれば、侵襲性カンジダ症全体に対して84%の感度をもつアビジン・ビオチン増幅EIA法によるCandida各菌種のマンナン検出限界は次の通りである。C. albicans/C. tropicalis/C. parapsilosis 1.0-2.8ng/ml, C. guilliermondii 6.7ng/ml, C. glabrata 20ng/ml, C. krusei >50ng/ml。したがって抗C. albicansマンナン抗体だけではC. glabrataやC. kruseiはきわめて検出し難く⁵⁰⁾、この点に関しては複数菌種由来のマンナンの各々に対する抗体を併用するのが検出感度を高めるのに有効と思われる。しかし感度に関してそれ以上に大きなネックは、マンナンが一過性にしが流血中に存在しない点にある^{42, 51)}。ウサギを用いた実験成績によれば、マンナンの血中半減期はたった2時間に過ぎない⁵²⁾。このことから、なぜマンナン抗原検出には検査を頻回行う必要があるかが理解できよう。

国内外において最初に製品化されたマンナン抗原検出系は、LA法を用いる「パストレックス®カンジダ (Pastorex® Candida)」である。この製品は、C. tropicalis由来のマンナン抗原 (C. albicans serotype A由来のものと同様) に対する単クローン抗体で感作したラテックスを試薬とする。これまでの報告を見る限り、特異度はいずれも予想通りほぼ100%と高い反面、感度は約30%^{43,50)} から50%前後^{16,29,42)}にとどまっている。この値を前出の「カンジ・テック®」検査と比較すると、特異度は勝っているものの、感度は同程度かむしろ低いようである。また菌種別の反応性については、C. albicans, C. tropicalisのほかC. guilliermondiiも陽性を示し、一方、C. parapsilosisとC. glabrataは弱陽性または陰性、C. kruseiは陰性、という結果が報告されている^{29,42,43)}。

一般に、LA法よりはEIA法のほうが高い感度を示すことが知られている。事実、同一の抗体プローブと臨床検体を用いてC. albicansおよびC. kruseiのマンナンをLA法とサンドイッチEIA法によって検出した比較試験の成績によれば、前者よりも後者の検出法のほうが約2倍高い感度(38% vs. 74%)を示したという⁵⁰⁾。同様のサンドイッチELISA法を用いたマンナン抗原検出系が、国内では2種製品化されている。

その一つ「プラテリア®カンジダAg (Platelia® Candida Ag)」は、「パストレックス®カンジダ」と同一の抗C. tropicalisマンナン単クローン抗体をプローブとしている。特異度は90~100%と良好であるが、感度は期待に反して40%程度にとどまる⁵³⁾。陽性菌種の範囲は比較的広く、C. krusei以外の主な菌種はすべて陽性を示すようである⁵³⁾。

もう一つの「ユニメディ・カンジダ®」は、国内で独自に開発されたマンナン抗原検出系である。この製品では、C. albicansマンナン抗原に対するウサギのポリクローン抗体をプローブとするサンドイッチELISA法と酵素サイクリング増幅法とを組み合わせた測定系が用いられている。実験的には特異度、感度とも良好なうえに、ポリクローン抗体を使用しているため広範囲のCandida菌種に対して陽性反応を示すことが期待される。その一方で、C. parapsilosisやC. glabrataの反応性は低く、C. kruseiに至ってはほとんど反応しないとする報告がある⁵⁴⁾。いずれにせよ実用化されてから日が浅く、まだ十分な臨床的評価成績が得られていない。

(3) エノラーゼ

エノラーゼ (enolase) は、酵母の解糖系の酵素として細胞質内に大量に存在する一方、抗原性も強いことから、侵襲性カンジダ症の診断マーカーとして利用することができる。またエノラーゼは、C. albicansのほかに、C. glabrataを除く

ほとんどすべての主要病原菌種にも共通してみられ、したがって起因菌種を問わずカンジダ症の診断に有用である55)。

抗原検査のマーカーとして *Candida* エノラーゼに最初に着目したStrockbineらの研究グループは、これを48-kDaタンパク抗原と同定し56)、後にエノラーゼであることが明らかになった57,58)。やがて二重サンドイッチリポソーム化イムノアッセイ法 (double-sandwich liposomal immunoassay) によるエノラーゼ抗原検出系が米国において「Directigen」の名で製品化された。Walsh et al 55) は、侵襲性カンジダ症を発症した癌患者を対象にしたプロスペクティブ試験を行い、特異度96%、感度75%という有望な成績を得た。その後、同様の結果がカンジダ血症患者に対するプロスペクティブ試験で確かめられている15、43)。この製品は、比較的高価なことなどが主な理由となって、広く普及する前に製造中止に至り、無論わが国では市販されなかった。

(4) HSP90関連細胞質性 *Candida* 抗原 (47-kDa抗原) 熱ショックタンパク (heat shock proteins; hsp) は、ストレスタンパクの名でも知られる高度に保存された普遍的なタンパクである。その分子量およびDNA塩基配列の相同性に基づいて、hsp 60、hsp 70、hsp 90などのファミリーに分けられる。なかでも *C. albicans* 由来のhsp90の構成成分である47-kDa抗原については、Matthewsらの研究グループによって精力的な検討が行われてきた17、18、59-62)。

イムノプロットした47-kDa抗原のバンドに対してアフィニティ精製された抗 *Candida* ウサギ抗血清をプローブとしたドット免疫結合法を用いて行った *C. albicans* 起因性の侵襲性カンジダ症患者を対象とする臨床評価試験では、感度84%という良好な結果が得られた59)。また抗原価は臨床経過とも相関し、回復患者で低下、死亡例で上

昇、*Candida* 定着患者では陰性かまたは弱陽性、非感染対照患者では全例陰性 (0/404) を示すなど、特異度もすぐれている60)。これらの成績に基づいて、ドット免疫結合法による47-kDa抗原検出系の開発が欧米で進められたが、未だ製品化には至っていない。

c. *Candida* 特異的代謝産物D-アラビニトール検出系

C. albicans のみならず、*C. glabrata* や *C. krusei* を除くほとんどすべての病原性 *Candida* 菌種もまた五炭糖アルコールの1種であるD-アラビニトール (D-arabinitol ; DA) を *in vitro* で産生する63,64)。これに対して、ヒト (哺乳動物) は、DA産生能をもたない (ただし、体液ことに髄液のなかには微量のDAが存在する)。したがって、血清や髄液などの体液中に含まれるDAは侵襲性カンジダ症の好適な検査マーカーとみなされ、1980年代以降検討が続けられてきた。

体液検体からのDAの検出には、当初はもっぱらガスクロマトグラフィーや質量分析が用いられた63-67)。しかしこれらの測定法は、高価な測定機器を必要とし、労力や時間もかかることから、一般臨床検査室への導入はほとんど不可能であった。その簡便な代替法として酵素蛍光法がわが国の曾山らによって開発された68-70)。初めに考案されたのは、検体に *Enterobacter aerogenes* 由来のDA脱水素酵素とNADを加え、DA酸化に伴って還元生成されるNADHによる蛍光増加の初速度を測定する方法であった68)。その後、この反応系にジアホラーゼ とレザズリンを加えた場合に生じる蛍光物質 (レゾルフィン) 濃度の増加の初速度がDA濃度と相関することを見出し、この原理に基いてより簡便な蛍光比色法による測定系が開発された69)。それを製品化したのが「ラボフィット® (Labofit®)」である

70)。

DA脱水素酵素を利用した酵素化学的DA検出法の大きな問題点は、この酵素がDAのほかにD-マンニトール (DM) も還元するために、DM含量が高い検体ほど見掛け上のDA値が高くなることである。この欠点は、反応系にDM脱水素酵素を予め加えて共存するDMの影響を除去することによって克服された。さらにレザズリンの代りに新しいジアホラーゼ基質 (WST-1) を用いて水溶性の黄色ホルマザンをつくらせることによって、通常の分光光度計による測定が可能となり、自動測定も容易になった71、72)。この製品が「アラビニテック・オート® (Arabinitec Auto®)」であり、非蛍光比色法とよばれて現在広く使用されている。

DAは糸球体濾過によって腎から排泄されるので、腎機能不全の患者ではDAの血中濃度が上昇して偽陽性の結果を与える結果となる66)。これを避けるために、血清検体中のDAとクレアチニン (Cr) の濃度比 (DA/Cr 比) を指標にする判定法がとられる66,73)。ガスクロマトグラフィーや「ラボフィット®」の場合には、DA濃度とCr濃度を別々に測定しなければならないが、「アラビニテック・オート®」ならば両者を同時に測定することができ、これも大きな利点である。

DA/Cr比の上昇は、*Candida*感染のない急性腎機能不全患者でもみられることから74)、近年欧米諸国においてはDAとL-アラビニトール (LA) の濃度比 (DA/LA比) を診断マーカーにすることに心が集っているようである。LAは、DAと同様にヒト (哺乳動物) の体液中にも存在し、腎機能不全があると上昇する。DA/LA比をとる利点は：(i) DA (およびLA) の濃度絶対値を測定する必要がなく、両異性体の濃度比を求めるだけでよいこと、(ii) 腎障害の影響を排除できること、(iii) 尿も検体として使用できること、などにある

75)。わが国ではDA/Cr 比を診断指標としているが、欧米ではDA/LA比をより重要視する傾向がみられる。

DAの検査マーカーとしての臨床評価に関してこれまで行われた幾つかのプロスペクティブ試験からは、好中球減少の有無にかかわらず侵襲性カンジダ症患者において血清中または尿中のDA/Cr比の上昇が示されている76)。なかでも注目されるのは、独自の酵素化学的検出法を用いて侵襲性カンジダ症発症がん患者247例を対象に試験を行ったWalsh et al⁷⁴⁾の成績である。それによると、検体を連続採取した場合のDA/Cr比上昇 (陽性) は、カンジダ血症例の80%、血液培養陰性の慢性侵襲性カンジダ症例の40%にみられたという。「ラボフィット®」についても小規模ながら国内で臨床評価試験が行われており、50~80%の感度、90%前後の特異度が得られている77,78)。「アラビニテック・オート®」の有用性に関しては、まったく報告がないものの、少なくとも特異度は向上しているものと推測される。

近年、早期診断におけるDAの検査マーカーとしての役割が欧米で見直されているようである。*Candida*が定着した高リスク (好中球減少) 患者の血清や尿中のDA値 (DA/Cr比またはDA/LA比) が非好中球減少患者や健常者よりも高いこと74,79,80) や、リスク因子の1つとされる細菌血症81) をもつ血液悪性腫瘍患者ではそれをもたない患者にくらべて有意にDA値が上昇していること74,80) に加えて、こうした症例では血液培養よりも早期にDA値が陽性になること74,80) や、DA値が治療効果と良好に相関すること80,82-84) が報告されている。これらの点を考え合せると、DA検査は高リスク患者における侵襲性カンジダ症の早期診断のみならず、発症ならびに治療効果のモニタリングにも役立つことが十分に期待

される。「ラボフィット®」および「アラピニテック・オート®」は、世界に先駆けてわが国で開発されたDA測定系であり、国内では容易に使用することができる。それにもかかわらずこれらの製品というよりはDA検査自体に対する国内の関心が低いために、充分利用されていないきらいがある。今後適切な臨床評価試験を通してその有用性を正しく評価することが必要と考えられる。

最近、基質特異性がより高い脱水素酵素を使用して測定を簡便化する試みが幾つかなされている。DAその他のポリオールと交叉反応しない(DA特異性の高い) *C. tropicalis*の組みかえ型DA脱水素酵素を使用した半自動比色法⁸³⁾ や、*C. albicans*の組みかえ型酵素を使った自動蛍光法⁸⁵⁾ がそれである。こうした新しい測定法の開発は、DA検査の信頼性や利用度の向上をはかるといふ観点からも注目されよう。

2. アスペルギルス症の血清診断法

アスペルギルス症の血清診断法は、病型に大きく依存する。病型によって生体の免疫応答がことなってくるからである。(i) 侵襲性アスペルギルス症 (invasive aspergillosis ; IA), (ii) 肺アスペルギローマ (pulmonary aspergilloma ; PAO), および (iii) アレルギー性気管支肺アスペルギルス症 (allergic bronchopulmonary aspergillosis ; ABPA) がアスペルギルス症の3大病型とされている。IAの大半は肺のみに病変を生じる侵襲性肺アスペルギルス症 (invasive pulmonary aspergillosis; IPA) であるが、一部の症例では脳をはじめ全身の様々な臓器を冒し、播種性アスペルギルス症とよばれることがある。

IA (以下IPAを含む) は、好中球減少などのリスク因子をもつ易感染患者に好発し、きわめて急性に進展することから、抗体産生をもたらすような免疫応答はふつう起こらない。加えて、感染早期に治療を開始しない限り、予後は著し

く不良である。したがって早期診断がきわめて重要となるが、BAL液や喀痰などの病巣由来検体を使っても起因菌の検出感度は低く、診断を画像所見、血清診断、遺伝子診断などに頼らざるを得ない症例が少なくない。IAの血清診断法は、上に述べた理由から、もっぱら特異抗原の検出に向けられる。

これに対して、PAOおよびABPAは、免疫能低下のない人に起こり、しかも慢性の経過を辿る。起因菌は病巣内に限局して存在するために、IAの場合よりもさらに検出しにくい。その一方、組織内真菌に対して強い液性免疫応答が引き起こされる⁸⁶⁻⁸⁸⁾。この理由から、血清診断は主として特異抗体検出によって行われる。

a. 抗*Aspergillus*抗体検出系

アスペルギルス症患者血清と反応する特異抗原の分離・同定、ならびにそれを用いた特異抗体の検出法に関する研究は、古く1960年代に始まる。これまで次にあげるような様々な検出法が検討されてきた。当初用いられたのは、(i) 免疫拡散 (immunodiffusion ; ID) 法⁸⁹⁾ と (ii) 免疫電気泳動 (immunoelectrophoresis ; IE) 法^{89,90)} であったが、その後、(iii) 補体結合反応 (CF) 法⁹¹⁾、(iv) ラテックス凝集反応 (latex agglutination ; LA) 法⁹²⁾、(v) 間接免疫蛍光 (indirect immunofluorescence assay) 法⁹³⁻⁹⁵⁾、(vi) 受身血球凝集反応 (passive hemagglutination ; PHA) 法⁹⁶⁾、(vii) 対向免疫電気泳動 (counterimmunoelectrophoresis ; CIEP) 法⁹⁷⁻⁹⁹⁾、(viii) 放射性免疫測定 (radioimmunoassay ; RIA) 法¹⁰⁰⁾、(ix) イムノブロット (immunoblotting) 法¹⁰¹⁾、(x) 各種ELISA法などの酵素免疫測定 (enzyme immunoassay ; EIA) 法¹⁰²⁻¹⁰⁴⁾、(xi) イムノゴールド測定 (immunogold assay) 法¹⁰⁵⁾、な

ど数々の方法がとられた。なかでもID法とCIEP法は、簡便で安価なこと、感度が適度に低く健康者が偽陽性反応を示さないこと、などの理由から、日常検査にはとくに好んで使用されてきた88、106)。またABPAの血清診断には、RIA法やEIA法による特異IgEおよびIgGの検出が有用とされている100、102、103)。

ID法、CIEP法およびPHA法の3者を比較検討した池本106) および浜本107) の成績によれば、PAOの血清診断にはCIEP法が感度(96%)、特異度(100%)とも最もすぐれている。これに、微量(4 μ l)の血清検体で足りることや、短時間(約15分)で結果が得られることなどの利点も加わって、日常検査に最適であるという。一方、IHA法については、ABPAにおいて高感度(85%)を示し、本病型の検査に役立つと報告している。

このように検出法は様々な工夫によって著しく進歩した反面、抗原としては培養濾液抽出粗抗原など精製されていないものが使用され続けた結果、検査法の定量化や標準化がなされなかった。そのために、特異抗体検出系をスクリーニングに使うことが疑問視され、とくに免疫不全患者では感度も特異度も不十分とされたきた109、110)。近年、*A. fumigatus*の培養濾液または菌体から分離した分子サイズのことなる様々なタンパクまたは糖タンパク成分について特異抗原としての診断的有用性の検討がなされるようになり、その過程で精製に成功した例も少なくない。18-kDaリボヌクレアーゼ(レストリクトシンrestrictocin)、アルカリ性プロテアーゼ、33-kDaセリンプロテアーゼ、38-kDaアスパラギン酸プロテアーゼ、40-および82-kDaメタロプロテアーゼ、88-kDaジペプチルペプチダーゼ(DPP)、90-kDaカタラーゼ、19-および27-kDa Cu-Znスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)などである111)。最近、これらの*A. fumigatus*由来精製抗原とくに DPP、リボヌクレアーゼ、アルカリ

性プロテアーゼなどを用いた血清学的検査が行われるようになった109、112-114)。しかも分子生物的手法を用いて当該抗原の遺伝子を大腸菌や酵母(*Pichia pastoris*など)で発現させて組みかえ型の純粋抗原を作成することが可能になったことから、培養からの分離精製の場合には避けられなかった強い免疫原性をもつ不純物の混入という厄介な問題が解消した。すでに幾つかの組みかえ型抗原については、天然型抗原と同一の免疫原性をもつことが確認され、特異抗体を定量的に測定するELISA法も開発されている109)。

現在のところアスペルギルス症診断用の特異抗体検出系の製品は1つもないが、遠からず出現するものと予測される。

b. *Aspergillus*抗原検出系

IAの血清診断法として現在最も高い信頼性をもつ検査法は、*Aspergillus*特異抗原としてのガラクトマンナン(galactomannan; GM)の検出系である。IA患者においては、感染が急速に進行することや、多くの場合免疫不全状態にあることなどの理由から、一般に感染を受けても特異抗体のレベルは上昇せず、したがってこれを診断マーカーとするのは不相当である。一方、IA患者の血清、尿、BAL液などの体液検体中には、*Aspergillus*抗原が遊離状態または免疫複合体をつくって存在することから、その検出系が血清診断に利用される111)。

このようなIA患者の体液とくに血清から検出される特異抗原として詳細な検討がなされるのは、*A. fumigatus*由来のGMがほとんど唯一である。IA患者がしばしばGM血症を来すことは、すでに1970年代初めに、米国CDCの研究グループがCIEP法を用いて明らかにした115、116)。診断マーカーとしてのGMの重要性は、ウサギの感染モデルでの実験からも支持され117)、さらにIA患者において抗GMポリクローン抗体を用いた

RIA法、EIA法、LA法などによって血清検体からGMが検出されることが証明されたのである(118-120)。GM抗原の分子サイズは、実験感染ウサギでの成績から50-100kDaと推定され(121)、後にA. fumigatus菌糸ホモジェネートの80-, 62-, および49-kDa成分の免疫優位オリゴガラクトシド側鎖と反応する単クローン抗体を使って確認された(122)。

このような経緯を辿って最初に製品化されたGM検出系が「パストレックス・®アスペルギルス (Pastorex® Aspergillus)」である。この検出系においては、A. fumigatusのGMに対して特異的なラット単クローン抗体がプローブとして使用され、LA法によってGMを検出する。この検査試薬は、ヨーロッパに続いてわが国へも導入され、主としてIA患者を対象とした診断的有用性の臨床評価試験が国内を含む多くの研究グループによって行われた(120, 123-129)。その結果、「パストレックス・®アスペルギルス」は、利便性や迅速性の点ではすぐれているものの、検出感度が低過ぎる(>15ng/ml)ことが判明した。

この欠点を改善することを目的に、同じ単クローン抗体を用いたELISA法(正確にはサンドイッチELISA法)がその後に開発された。ELISA法この使用により、血清中GM 1ng/mlまで検出可能となり(88, 130)、現在のところ最も高感度の検出系と目されている(131)。それをキット化した製品が「プラテリア・®アスペルギルスAg (Platelia® Aspergillus Ag)」である。本キット(ELISA法)については、「パストレックス・®アスペルギルス」(LA法)をはじめ、PCR法や後出の(1,3)-β-D-グルカン検出法などとの比較評価試験が数多く行われた(130,132-140)。いずれの結果も感度および特異度、とくに後者の点でELISA法がLA法を上回ることを示した。例え

ば、IA発症リスクをもつ患者61例の血清532検体を用いて検討したVerweig et al(130)の成績によれば、感度と特異度はELISA法でそれぞれ90%と84%、LA法ではそれぞれ70%と86%であった。このようにELISA法の導入によって、感度は著しく改善されたが、特異度はほとんど変わらず、10%程度の偽陽性例がみられた(141)。またELISA法では、LA法よりも少なくとも2~3週間早く抗原が検出されることが確かめられており(125,130,142)、早期診断を容易にした利点は大きい。このことは、IAの臨床症状が現れる前にGMが検出されたという成績(131)からも支持される。さらに、国内研究グループの成績からは、PAO症例の多くがELISA検査で陽性を示すことが判明した(136-139)。ELISA法の長所はほかにもあり、(i) 検査の再現性が良好なこと(143)、(ii) GMが一旦検出された後は、病気が続く限り検体をいつ採出しても陽性を示すこと(従って頻回検査する必要がない)、(iii) 血清中のGMレベルが感染の強さを良好に反映する結果、治療効果のモニタリングの指標となること(131,138,144,145)、などがあげられる。

ELISA法によるGM検出系の実用化によって、IAの血清診断は大きく前進したが、Aspergillus spp.以外の真菌や未確認の血清成分との交叉反応性(132,141)による偽陽性例がすくなくない(130,132,133)。このELISA法の欠点を改善するために、免疫PCR法 (immuno-PCR method) (146) や競合結合阻害酵素免疫法 (competitive binding inhibition enzyme immunoassay) (147) といった新しい検出法の開発が進められている。前者の方法では感度、後者では特異度の向上が期待される。

c. Aspergillus 特異的代謝産物 D-マンニトール検出系