

# ELISA を用いたカンジダマンナン抗原検出キットの 臨床的有用性の検討

川崎医科大学呼吸器内科

吉田耕一郎 二木 芳人 宮下 修行 松島 敏春

(平成 13 年 10 月 15 日受付)

(平成 14 年 4 月 30 日受理)

---

Key words : *Candida* mannan antigen, ELISA, comparative study

---

## 要 旨

1999 年に川崎医科大学附属病院で診断されたカンジダ血症症例 12 例から採取・保存されていた血清 34 検体と健常ボランティア 15 名から採取した血清 15 検体を対象に、ELISA を応用した新しいカンジダマンナン抗原検出キット UNIMEDI *Candida* (ユニチカ, 大阪) と PLATELIA *Candida* Ag $\alpha$  (パイオラッド富士レビオ, 東京) の臨床的有用性を検討した。これらの感度は各々 82.1% , 40.0% , 特異度は両者とも 100% であった。両者はいずれも従来のカンジダ抗原検出系キットより高い感度を示していたが、その結果に少なからず相違が認められた原因はカンジダ菌種により各々試薬の反応性に違いがあるためと考えられた。両者とも深在性カンジダ症の補助診断法として早期診断の一助となり得ると思われたが、 $\beta$ -グルカンなどと組み合わせて使用することで、さらに有用性が高まるものと考えられた。今後、さらに多くの症例を蓄積して詳細な検討を行い、両キットの特性を明らかにしていく必要がある。

[ 感染症誌 76 : 536 ~ 541 , 2002 ]

## 序 文

日和見感染として発症する深在性カンジダ症は免疫不全患者には頻度が高く、宿主の生命予後を左右する重要な合併症の一つである。早期診断・早期治療が治療成功の鍵となるが、全身状態の不良な宿主や出血傾向を認める患者では病巣から直接採取する検体でカンジダを分離し、確定診断することが困難な場合も少なくない。そこで臨床現場ではいくつかの血中カンジダ抗原検出法や (1-3)  $\beta$ -D-グルカン ( $\beta$ -グルカン) 測定が補助診断法として汎用されている<sup>1)</sup>。しかし、いずれも感度、特異度、手技の簡便性などの面から問題があり、

十分に満足できる方法のないのが現況である<sup>2)-5)</sup>。今回、我々は ELISA を応用して感度の向上を図った 2 つの新しいカンジダマンナン抗原検出キットの臨床的有用性を検討した。

## 材料と方法

1999 年 1 月から 12 月までの期間に川崎医科大学附属病院に入院中で、血液培養でカンジダが分離された患者 12 例からカンジダ易熱性蛋白抗原検出目的に採取・保存されていた血清 34 検体と、健常ボランティア 15 名から採取した血清 15 検体を材料とした。各ボランティアには各々に本研究の趣旨を説明し、同意を得た上で検体を採取した。各血清を以下に示すカンジダ抗原測定法で再測定し比較検討した。感度の評価には同一患者から連続して採取された検体のうち、血液培養でカンジ

---

別刷請求先 : (〒701 0192) 岡山県倉敷市松島 577

川崎医科大学呼吸器内科

吉田耕一郎

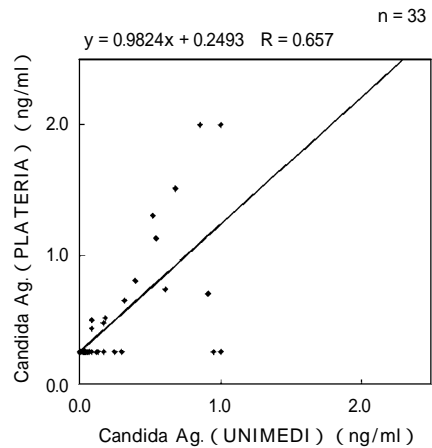
ダが分離された時期の計 28 検体のみを用いた。特異性の評価は 15 例の健常ボランティアから採取した検体を用いて行った。さらにカンジダ血症症例では同日に測定されていた  $\beta$ -グルカン値との比較も行った。カンジダ抗原の検出には、マンナン抗原検出系として、モノクローナル抗体を用いた ELISA 法による PLATELIA *Candida* Ag<sup>6)</sup> (モノクローナル法; バイオラッド富士レビオ, 東京) と、ポリクローナル抗体を用いた ELISA 法による UNIMEDI *Candida*<sup>7)</sup> (ポリクローナル法; ユニチカ, 大阪), さらに PLATELIA *Candida* Ag と同一のモノクローナル抗体を用いたラテックス凝集反応を応用した PASTOREX *Candida* (ラテックス法; バイオラッド富士レビオ, 東京) を使用した。モノクローナル法およびラテックス法は *C. albicans* の死菌を用いてラットを感作し作製した抗マンナンモノクローナル抗体 (EBCA-1) を使用し、ポリクローナル法は *C. albicans* から抽出・精製したマンナンを家兎に感作して作製したポリクローナル抗体を使用したキットである。また、易熱性蛋白抗原検出系としては、CAND-TEC (ラムコジャパン, 大阪) を使用した。本抗原はカンジダの構成成分ではなく、補体第 3 成分とカンジダマンナンを含む分子量 400kDa 以上の複合体であることが示唆されているが、その本体は明らかにされていない<sup>5)</sup>。一方、血中  $\beta$ -グルカン値測定にはアルカリ処理 発色合成基質カイネティック法である FUNGITEC G TEST MK (生化学工業株式会社, 東京) を使用した。測定手順は各々のキットの添付文書に準拠した。モノクローナル法は 0.5 ng/ml, ポリクローナル法は 0.05ng/ml, CAND-TEC は 1:8, FUNGITEC G TEST MK は 20pg/ml を基準値とした。また PASTOREX *Candida* は陰性を正常とした。

### 成 績

症例の内訳は男性 8 例, 女性 4 例。年齢は 37 ~ 85 歳 (71.7  $\pm$  12.5 歳) であった。各々の症例の基礎疾患は固形癌 2 例, 心不全 2 例, 脳血管障害 2 例, および白血病, 重症肺炎, インフルエンザ肺炎, パーキンソン病, 熱傷, 類天疱瘡が各 1 例ずつであった。

平成14年 7月20日

Fig. 1 No certain correlation was recognized in the results of serum *Candida* antigens detected by two kits with ELISA.



血中からの分離真菌は *C. albicans* 5 例, *C. parapsilosis* 2 例, *C. tropicalis* 2 例, *C. glabrata* 1 例, *C. guilliermondii* 1 例, *Candida* sp. 1 例であった。

他方、健常ボランティアは男性 7 例, 女性 8 例で、年齢は 27 歳から 59 歳 (38.3  $\pm$  9.7 歳) であった。

ELISA による両マンナン抗原検出キットの測定結果の比較は、全 34 検体のうち、1 検体で検体量不足により両者での測定が不可能であったため、33 検体で検討した。Fig. 1 にこの結果を示した。相関係数は  $R = 0.657$  で、両法の測定値間に明らかな相関は認められなかった。判定結果の比較では両法とも陽性を示したものが 11 検体、両法とも陰性を示したものが 10 検体で一致率は 63.6% であった。モノクローナル法では 2 検体で判定保留の結果であった。モノクローナル法陰性、ポリクローナル法陽性の不一致を示したものは 10 検体認められた。判定結果不一致検体の原因カンジダ種の内訳は *C. parapsilosis* 7 検体, *C. guilliermondii* 1 検体, *Candida* sp. 2 検体であった。一方、ELISA によるカンジダ抗原測定値と血中  $\beta$ -グルカン値の比較 (Fig. 2) では、両法とも  $\beta$ -グルカン値との明らかな相関は示さず、 $\beta$ -グルカン陽性でマンナン抗原陰性を示した検体が少なからず認められた。両法の  $\beta$ -グルカン値との定性結果一致率

Fig. 2 No accurate correlation was seen in the results of serum *Candida* antigens detected by two kits with ELISA and serum  $\beta$ -glucans.

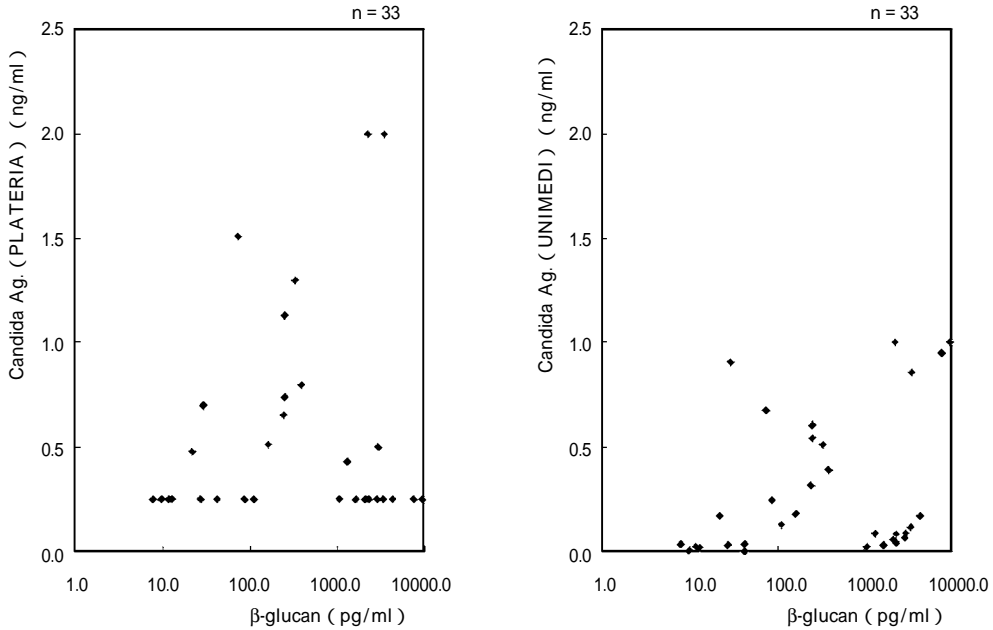


Table 1 Sensitivity of respective methods for *Candida* antigen detection in serum samples from patients with candidemia

	CAND-TEC <sup>®</sup>	PASTOREX <sup>®</sup> <i>Candida</i>	PLATELIA <sup>®</sup> <i>Candida</i> Ag	UNIMEDI <sup>®</sup> <i>Candida</i>
Positive ratio	9 / 28	2 / 27	10 / 25	23 / 28
Sensitivity	32.1%	7.4%	40.0%	82.1%

はモノクローナル法 48.4%，ポリクローナル法 81.8% であった。

他方，使用した 4 種のカンジダ抗原検出キットの感度を Table 1 に示した。対象の 28 検体の内，ラテックス凝集法によるマンナン抗原検出法では 1 検体で検体量不足のため，モノクローナル法では 1 検体で検体量不足，2 検体で判定保留と評価されたため，それぞれ母集団から削除し，各々の母集団は易熱性蛋白抗原検出法 28 検体，ラテックス凝集法 27 検体，モノクローナル法 25 検体，ポリクローナル法 28 検体とした。易熱性蛋白抗原検出法の感度は 32.1%，ラテックス凝集法 7.4%，モノクローナル法 40.0%，ポリクローナル法 82.1% の成績であった。これに対して  $\beta$ -グルカンの感度

は 100% であった。次に原因カンジダ種別の陽性率を Table 2 に示した。*C. albicans* ではモノクローナル法 85.7%，ポリクローナル法 88.9% であった。*C. parapsilosis* ではポリクローナル法で 63.6% の陽性率であったのに対し，モノクローナル法では 0% の結果であった。*C. tropicalis*，*C. glabrata* では両法とも 100% の陽性率であった。*C. guilliermondii*，*Candida* sp. ではモノクローナル法では両者とも 0%，ポリクローナル法ではそれぞれ 100% であった。また，健常ボランティアから採取した検体を用いて求めた特異性は Table 3 に示したように易熱性蛋白抗原検出法，ラテックス凝集法によるマンナン抗原検出法，モノクローナル法，ポリクローナル法ともすべて 100% の優

Table 2 Positive ratio of two methods using ELISA in serum samples in respective causative *Candida* sp.

	PLATERIA <sup>®</sup> <i>Candida</i> Ag	UNIMEDI <sup>®</sup> <i>Candida</i>
<i>C. albicans</i>	6/7 (85.7%)	8/9 (88.9%)
<i>C. parapsilosis</i>	0/11 (0%)	7/11(63.6%)
<i>C. tropicalis</i>	3/3 (100%)	3/3 (100%)
<i>C. glabrata</i>	1/1 (100%)	1/1 (100%)
<i>C. guilliermondii</i>	0/1 (0%)	2/2 (100%)
<i>Candida</i> sp.	0/2 (0%)	2/2 (100%)

Table 3 Specificity of respective methods for *Candida* antigen detection in serum samples from 15 healthy volunteers

	CAND-TEC <sup>®</sup>	PASTOREX <sup>®</sup> <i>Candida</i>	PLATELIA <sup>®</sup> <i>Candida</i> Ag	UNIMEDI <sup>®</sup> <i>Candida</i>
Positive ratio	0/15	0/15	0/15	0/15
Specificity	100%	100%	100%	100%

れた結果であった。

### 考 察

深在性カンジダ症も他の真菌症と同様、直接原因真菌を分離し、診断を確定することは困難である。臨床現場ではいくつかの血清補助診断法が用いられているが、いずれも感度あるいは特異性の面で問題が残る<sup>1, 5, 8)</sup>。他方、研究室レベルでは細胞質抗原として47kDa熱ショック蛋白質の検出や遺伝子診断法の開発が検討されているもののまだ実用化されていない<sup>5)</sup>。1990年にフルコナゾール(FLCZ)が臨床導入されて以来、剖検例で認められるカンジダ症は減少傾向にあった<sup>9)</sup>ものの、近年、FLCZ耐性*C. albicans*や、本来アゾール系抗真菌薬に低感受性の*C. glabrata*、*C. krusei*などnon-*albicans Candida*の増加傾向の報告<sup>10)-12)</sup>が相次ぎ、新たな臨床的問題として浮上してきている。これらはFLCZが予防的あるいはempiric therapyとして、深在性真菌症発症の高リスク患者に汎用されてきたことの功罪と言えよう。このような現状を踏まえ、高い臨床的有用性を有したカンジダ症の血清補助診断法の確立は急務であると考えられる。

今回検討した2つの新しい血中カンジダマンナン抗原検出キットはELISAを応用することによ

り感度の向上を図ることを目的に開発されたものである。マンナンの最小検出感度はモノクローナル法で0.25ng/ml、ポリクローナル法では0.05ng/mlと若干の開きはあるが、従来のラテックス凝集法を用いたマンナン抗原検出法PASTOREX *Candida*の2.5ng/mlと比較して、理論上極めて微量のマンナンを検出可能となっている。

全体に両法の測定値の相関は明らかではなかった。これはポリクローナル法陽性、モノクローナル法陰性と測定結果の不一致を認めた検体が少なからず存在したためと考えられた。また、今回のポリクローナル法の感度は82.1%と従来法を大きく上回る好成績であったが、これに対し、モノクローナル法では40.0%と低い成績が得られた。これらの結果はTable 2に示した通り、原因カンジダ種に応じて、各々の陽性率に大きな不一致が生じたことに起因している。*C. guilliermondii*に関しては検体数が少ないため両者の反応性について言及することはできないが、最も強く影響を及ぼしたのは*C. parapsilosis*における陽性率の差異であると考えられた。モノクローナル法で使用する抗体はウェスタンブロット法で*C. albicans*、*C. tropicalis*、*C. glabrata*、*C. parapsilosis*には広く反応するが*C. krusei*にはほとんど反応しないことが

知られている<sup>13)</sup>。また、ポリクローナル法の試薬は *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. lusitanae* と強く反応するが *C. krusei* に対する反応性は低く, *C. parapsilosis*, *C. grlablata* との反応性は中間的であったと報告されており<sup>7)</sup>, これまでの基礎的検討では *C. parapsilosis* に対する両者の反応性はいずれも比較的良好とされている。今回の検討で2法間に *C. parapsilosis* の陽性率に大きな差異が生じた原因は明らかではないが, 未発表のデータではモノクローナル法で *C. parapsilosis* に対する反応性が劣っていたとするものもあり, マンナン抗原検出にポリクローナル抗体を用いた方がより幅広い菌種反応性を有する可能性が示唆された。また, ポリクローナル法では最小検出感度 0.05ng/ml 以上を陽性とし, モノクローナル法では 0.5ng/ml が陽性基準値として設定されていることも両者の感度に少なからず影響を及ぼしている可能性がある。一方, 両法とも陽性結果であった検体ではモノクローナル法がポリクローナル法の測定値の約2倍とより高値を示す傾向にあった。この測定値間に生ずる差異の原因は現在のところ不明であり, 今後の検討が待たれる。

今回の検討でも従来から用いられている CAND-TEC と PASTOREX *Candida* の感度は低く, これまでの認識<sup>2)</sup>と大差ない結果で, これらの臨床現場における使用には大きな限界があると思われた。

一方, 健常コントロールを用いた特異性の検討ではモノクローナル法, ポリクローナル法とも100%と優れた成績が得られた。両法の特異性に関する報告は若干数ある。非真菌感染臨床検体を用いたポリクローナル法の検討<sup>7)</sup>では特異性100%, また健常コントロールおよび有病コントロールを用いたモノクローナル法の検討<sup>6)</sup>では特異性98%であり, 今回の成績は過去の検討とよく合致する結果であった。他方, 我々は以前, 今回の検討対象以外に肺アスペルギローマ症例とトリコスポロン血症症例の2例で, 連続して採取された血清からポリクローナル法およびモノクローナル法によるマンナン抗原検出を試みている。この際の両者の特異性はモノクローナル法50%, ポリク

ローナル法40%で, 健常コントロールを用いた今回の成績と比して著しく低い結果であった。ELISAの応用により感度の向上が期待される両法であるが特異性の低下は懸念される点であり, 臨床における検査の運用上, 重要なポイントとなる。不必要な抗真菌薬投与を避けるためにも, 今後多くの有病コントロールを用いた詳細な評価が必要である。

また, 今回の検討では両法とも $\beta$ -グルカン値との明らかな相関は認められなかった。これは各々の感度の違いに由来するものと考えられるが,  $\beta$ -グルカン測定キットの非特異反応検出<sup>14)</sup>, マンナン抗原のクリアランス時間<sup>15)</sup>などの要因も関連して原因している可能性が考えられる。 $\beta$ -グルカン値とカンジダマンナン抗原の比較については検出対象が異なっているため, 単純に比較することには問題もあると考えられるが, 深在性真菌症の原因カンジダ種によって抗原検出性が異なる本両キットの特性を明らかにするためには, さらに症例を蓄積し, カンジダ種ごとに $\beta$ -グルカン値とマンナン抗原測定値の比較を行う必要があるであろう。

ELISAを応用した新しいカンジダマンナン抗原検出キットはいずれも従来のカンジダ抗原検出法と比較して高い感度を示していた。特にポリクローナル法では82.1%と従来法を大きく上回る感度が示され期待がかかる。深在性カンジダ症の発症以前からマンナン抗原の経時的測定が可能であった1例において, ポリクローナル法では $\beta$ -グルカンと同時に, モノクローナル法より3日早くマンナン抗原の検出が可能であった。ただし, 今回の検討では全体にモノクローナル法, ポリクローナル法とも治療経過を十分に反映した測定結果は得られなかった。診断および治療効果判定の精度をより確実にするためには,  $\beta$ -グルカン値測定など, いくつかの補助診断法を組み合わせ, 繰り返し検査を行うことが肝要と考えられた。

これまで深在性カンジダ症は *C. albicans* の原因することが圧倒的に多かったが, 最近では non-*albicans Candida* の増加が問題視されている。各キットのカンジダ種別感度や特異度を明らかにす

ること、また遺伝子診断法の適応などが臨床現場では重要なポイントとなる。本法の臨床評価に関する報告はわが国ではほとんどない。今後さらに対象を増やして詳細な検討を続ける必要がある。

### 文 献

- 1) 前崎繁文：深在性真菌症の診断 III 血清学的診断。河野茂編，深在性真菌症 これまでに解決したことこれから解決すべきこと。診療新社，大阪，2000；p. 54-63.
- 2) 宮崎幸重：血清学的診断法 1. カンジダ症。河野茂編，深在性真菌症臨床診断マニュアル。メディカルレビュー社，大阪，1997；p. 25-42.
- 3) 吉田耕一郎，二木芳人：肺カンジダ症。臨床と微生物 2000；27：155-8.
- 4) 光武耕太郎，河野 茂，松田治子，吉富祐子，宮崎義継，東山康仁，他：深在性カンジダ症のマウス感染モデルにおける血中抗原の検出。感染症誌 1992；66：716-20.
- 5) 山口英世：真菌症診断法の進歩 免疫血清学的診断/遺伝子診断。伊藤章編，真菌症のすべて 最新知見からの現状と展望。医薬ジャーナル社，大阪，1997；p. 29-56.
- 6) Sendid B, Tabouret M, Poirot JL, Mathieu D, Fruit J, Poulain D : New enzyme immunoassays for sensitive detection of circulating *Candida albicans* mannan and antimannan antibodies : useful combined test for diagnosis of systemic candidiasis. J Clin Microbiol 1999 ; 37 : 1510-7.
- 7) 新崎晃弘，平野真弓，渡辺光雄，藤田信一：ELISA 法によるカンジダマンナン抗原の高感度検出法の基礎的検討。機器試薬 2000；23：197-203.
- 8) Kohno S, Mitsutake K, Maesaki S, Yasuoka A, Miyazaki T, Kaku M, et al. : An evaluation of serodiagnostic tests in patients with candidemia : beta-glucan, mannan, *Candida* antigen by Cand-Tec and D-arabinitole. Microbiol Immunol 1993 ; 37 : 207-12.
- 9) 久米 光，阿部美知子：肺真菌症の疫学。臨床と微生物 2000；27：133-9.
- 10) 前崎繁文：抗真菌薬耐性真菌の現状と対策。化学療法の領域 2000；16：1142-7.
- 11) 山住俊晃，黒田隆也，大畠恒子，尾鼻康朗，古田格：微量液体希釈法による臨床分離 *Candida albicans* の薬剤感受性成績の検討。感染症誌 1998；72：813-9.
- 12) Odds FC : Resistans of yeasts to azole-derivative antifungals. J Antimicrobial Chemotherapy 1993 ; 31 : 463-71.
- 13) Jacquinet PM, Plancke Y, Sendid B, Strecker G, Poulain D : Nature of *Candida albicans*-derived carbohydrate antigen recognized by a monoclonal antibody in patient sera and distribution over *Candida* species. FEMS 1998 ; 169 : 131-8.
- 14) 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(1-3)-β-D-グルカン測定値不一致の原因に関する検討。真菌誌 2001；42：237-42.
- 15) 山口英世：真菌症対策の基礎知識 1 真菌症の検査と診断。山口英世著，病原真菌と真菌症，南山堂，東京，1999；p. 48-71.

### Clinical Utility of Serum *Candida* Mannan Antigen Detection Kits Using ELISA

Koichiro YOSHIDA, Yoshihito NIKI, Naoyuki MIYASHITA & Toshiharu MATSUSHIMA  
Division of respiratory diseases, Department of medicine, Kawasaki Medical School

The clinical utility of two serum *Candida* mannan antigen detection kits with ELISA, UNIMEDI *Candida* and PLATERIA *Candida* Ag, was investigated. Thirty-four serum samples from 12 cases with candidemia diagnosed at Kawasaki Medical School Hospital in 1999 and 15 samples from 15 healthy volunteer were examined. The sensitivities and specificities of the two kits were 82.1% and 40.0%, 100% and 100% respectively. This sensitivity was higher than that achieved with the conventional methods. However, it was realized that the discrepancy between the sensitivity of these two kits was quite significant. This may have been caused by a difference in the reactivities of the respective kits against different species of *Candida*. A combined application of these methods and other supportive diagnostic methods, such as serum (1-3)-β-D-glucan detection, will improve their utility. A larger number of cases should be evaluated to clarify the characteristics of these new kits.