

総 説

## 集中治療室における深在性真菌症に対する遺伝子診断の応用

有 嶋 拓 郎 武 澤 純

名古屋大学医学部附属病院集中治療部

### 要 旨

集中治療室に入室する患者はさまざまな病態や病期であり、しばしば感染症の同定や治療に難渋する。深在性真菌症は頻度こそ少ないがこうした疾患のひとつである。われわれは、*Candida* 属 5 種と *Aspergillus fumigatus* を同時に同定できる測定系 (Multiplex PCR) を用いて真菌の遺伝子診断を臨床応用してきた。

(I) 臨床的意義: 8 例の臨床で深在性真菌症が強く疑われた症例に対して診断と通常の検査を比較したところ遺伝子診断は培養検査に比較して良好な感度 ( $p < 0.05$ ) で白血球数や CRP は高い傾向にあった。血液、腹水、胸水、髄液などの検体からの PCR 陽性結果は臨床所見に合致するものであった。本測定系での測定感度は 50–100 CFU/ml 程度であったことから、常在菌との区別の困難な痰、尿の陽性例においても相当量の菌数の存在を意味しており治療開始の判断材料となった。

(II) 工夫: 小児悪性腫瘍症で真菌血症を疑う 5 症例に対して Multiplex PCR 法による遺伝子診断を実施した。初回の検査で陽性であったのは 20 検体中 10 検体 (50%) であった。4 検体については 1–2 日培養後の遺伝子検査も実施したところ 1 検で陽性化した。培養後の遺伝子診断は真菌感染症の診断率向上に寄与すると考えられる。

ベッドサイド検査と違いまだ十分簡便とはいいがたいが適中率を向上させることで多種同時測定系の臨床意義が高まっていくものと思われる。

**Key words:** 深在性真菌症 (deep mycosis), PCR, 多重感染 (super infection)

### 序 文

厳密なベッドサイド観察が 24 時間継続される ICU であっても深在性真菌症の的確な診断はしばしば困難であり、疑わしい症例には経験的治療を実施している。臨床検体中の真菌の発育はしばしば緩慢であり培養により菌体を早期に同定することが困難なことが最大の理由となっている。本邦における深在性真菌症治療ガイドラインでも疑診に対して治療薬の選択が推奨されている<sup>1)</sup>が、出来るだけ確定診断を得て治療に結びつけることが、救急・集中治療領域では特に急務といえる。また、以前は真菌感染症例に対する注射薬も限られたものしかなかったことから薬剤選択に悩む必要もなかったし、薬剤耐性の問題も抗生物質ほど顕在化しなかった。今後新薬の開発発売が進んでいくと、薬剤選択、真菌感受性などに寄与する情報源として種のレベルまで同定される遺伝子診断の有用性が脚光をあびることになるとと思われる。

今回、6 種の真菌を同時に検出できるようにプライマーを混合した PCR 法を実施して臨床応用してみた。さらに若干の工夫もしてより臨床に即した情報が得られるように試みた。

### 材料および方法

#### I) 臨床応用

2000 年から 2002 年までに名古屋大学医学部附属病院 ICU で治療した深在性真菌症を臨床的に強く疑う 8 症例を対象とした。血液、尿、気管内喀痰、脳脊髄液、胸水、腹水などの臨床検体を患者から採取して、培養あるいは PCR に供した。遺伝子の抽出は市販キット (Fast DNA Kit, Bio 101, Joshua Way, Vista, Calif., USA) を用いて、臨床検体により若干の差異を持たせた<sup>3)</sup>。プライマーは、*Candida* 属 5 種と *Aspergillus fumigatus* の 6 個を混合したもので、一回の行程でこれら 6 種を同時に検出できるものであるが、PCR は 2 ステップで行った。

#### II) 工夫

(1) *Candida albicans* の AMI4 株を用いて菌体を 10 個/ml と 100 個/ml になるように GYEP 培地に混合して 30°C の恒温装置内で培養して、24 時間ごとに真菌数を調べて増殖速度を調べた。

(2) 小児血液癌疾患患者で骨髄移植を実施してその後に発熱が持続して真菌症が強く疑われて PCR 検査を実施した 6 例を対象とした。検体は患者の中心静脈カテーテルから採取した血液をバイオメリックス社 (Durham, Canada) のカルチャーポトル (Bact/ALERT) に 1 ml を混入したものを検体として使用した。うち 4 検体につ

別刷請求先: 有嶋 拓郎

〒466-8550 名古屋市昭和区鶴舞町 65 番地  
名古屋大学医学部附属病院集中治療部

Table 1. Profile

2000.5~2002.4

Case	y.o. gender	Disease and treatment	Pathogen	ICU stay	Outcome
1	52M	Leukemia, chemotherapy	<i>C. albicans</i>	13	dead
2	55M	Hepatitis, steroid puls	<i>A. fumigatus</i>	65	dead
3	86M	Colon cancer, Sigmoidectomy	<i>C. albicans</i>	14	dead
4	72M	Gastric cancer, Gastrectomy	<i>C. parapsilosis</i>	22	dead
5	59M	Cerebral infarction	<i>C. parapsilosis</i> <i>C. albicans</i>	8	dead
6	53M	Pulmonary aspergillosis, lung lobectomy	<i>A. fumigatus</i> <i>C. parapsilosis</i>	8	dead
7	60M	Aortic aneurysm, Replacement of descending aorta	<i>C. albicans</i>	52	alive
8	68M	Cushing synddrome Thymus resection	<i>C. albicans</i> <i>C. parapsilosis</i>	65	alive

Table 2. Super infection of fungus

PCR (+)	33			
	<i>C. alb</i>	24	saliva (3) suputum (5) urine (9) gastric fluid (4) ascites (2) blood (1)	
	<i>C. par</i>	2	blood (1) CSF (1)	
	<i>C. alb</i> + <i>C. par</i>	4	saliva (1) sputum (1) blood (2)	
	<i>C. alb</i> + <i>C. glb</i>	1	urine (1)	
	<i>C. alb</i> + <i>A. fum</i>	1	BAL (1)	
	<i>C. alb</i> + <i>C. par</i> + <i>C. glb</i>	2	blood (1) Gastric fluid (1)	
PCR (-)	96		saliva (14) suputum (16) urine (10) gastric fluid (6) ascites (4) blood (38) pleural fluid (6) stool (2)	

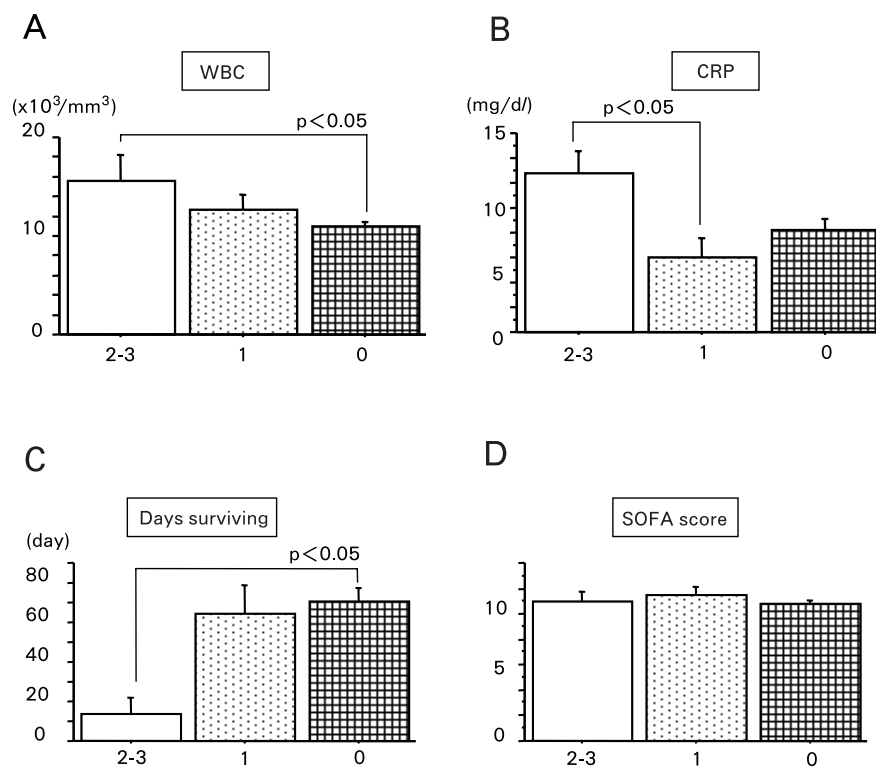


Fig. 1. Characterizations of mixed fungal infection

2-3 : mixed fungal infection (n=8) 1 : simple fungal infection (n=26) 0 : No fungus was detected for pathogen. (n=96)

A : The relation to WBC (white blood cell) B : CRP C : Survived day after clinical sample collected for PCR.

D : SOFA score Sequential organ failure assessment score

いては、24時間の培養後にもう一度 PCR を実施して陽性率が向上するかを検討した。

結 果

I) 臨床応用

(1) Multiplex PCR の臨床的意義付け

ICU に 1 週間以上在室して 38°C 以上の発熱を 1 日 1 回は計測した症例で臨床的に真菌感染症が強く疑われた症例を対象とした。症例の内訳は Table 1 に示した。これらの患者の 26 個の臨床検体で病院の中央検査室の培養検査と同時に PCR を実施した。培養検査で陰性と診断された 22 検体中 9 検体 (40.1%) で PCR 陽性となった。培養陽性の 4 検体は PCR でも陽性であり、培養が陽性で PCR 陰性の検体はなかった。PCR 検査の感度の優位性が示された。 ( $\chi^2=5.16$   $p<0.05$ )

毎週月曜日に監視培養として採取された血液、気管内喀痰、胸水、腹水等を用いて Multiplex PCR を実施する

としばしば真菌の混合感染も検出された (Table 2)。検出された菌種の数により 2 ~ 3 個の混合感染 (n=8)、1 個の単感染群 (n=26)、0 個の非感染群 (n=96) に分類してそのときの白血球数、CRP、予後 (生存日数)、SOFA score で比較した。真菌の混合感染があるときには WBC、CRP はいずれも非感染や単感染の時期よりも高い傾向にあった。また、身体全体の重篤度を示す SOFA score<sup>2)</sup> では差異はなかったが真菌の混合感染が生じるとその後の予後は 2 週間程度できわめて不良であった (Fig. 1C)。

(2) 症例提示

ここで真菌の混合感染をきたした典型例として Table 1 の症例 6 を提示する。患者は 53 歳、男性。既往歴として胚胎蛋白症を 1995 年からわずらい外来治療を受けていた。現病歴 2001 年 11 月、咳と痰を主訴に前医へ入院した。精査の結果、肺アスペルギルス症と診断された。外来にてイトリゾールを投与していたが血痰や胸

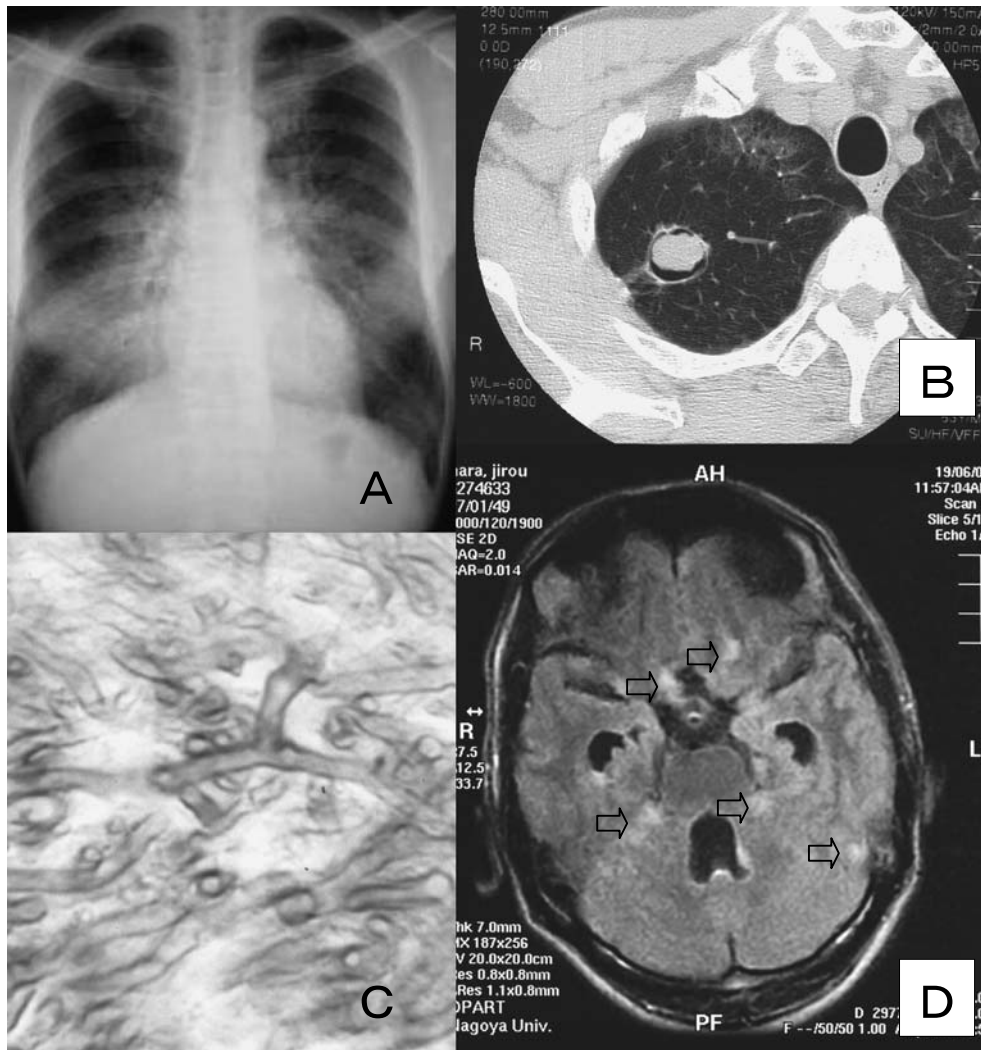


Fig. 2. Case 6, Findings of clinical imaging

- A: Chest XP A coin lesion is shown in the right upper lobe.
- B: Chest CT A typical fungus ball is shown in right upper lobe.
- C: HE stain  $\times 400$  *Aspergillus* was diagnosed by a "Y" shaped fungal thread.
- D: Head MRI on 16th hospital day Infectious lesions are indicated by white arrow.

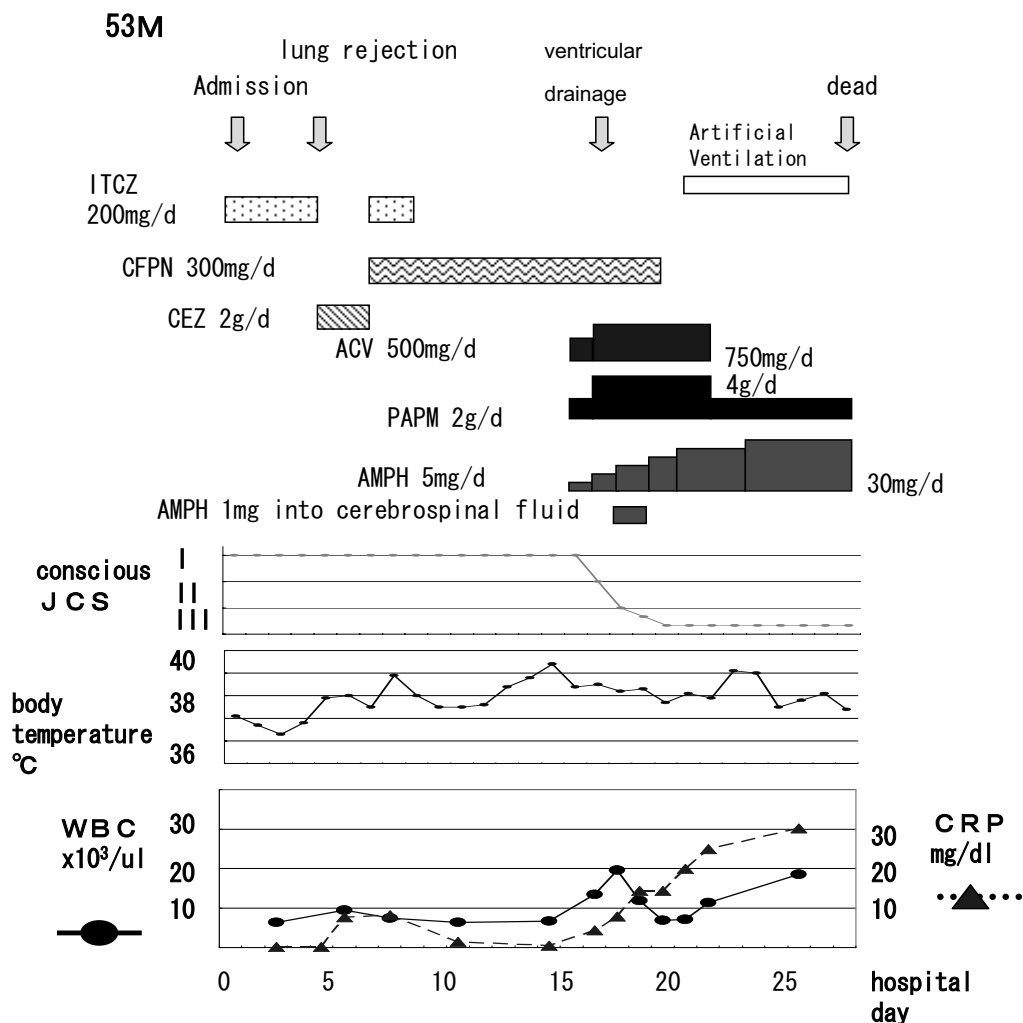


Fig. 3. Clinical course of Case 6

CFPN: cefcapene, PAM/BP: Panipenem, ACV: Aciclovir  
 AMPH : Amphotericin B, JCS: Japan Coma Scale

部レントゲン写真上の腫瘍陰影が改善しないために2002年当院へ紹介となった。同年6月菌塊病変切除目的で入院となった。肺切除術前日の胸部レントゲン写真 (Fig. 2A) と胸部CT (Fig. 2B) では典型的な肺アスペルギルス症の菌塊所見を呈していた。

第4病日胸腔鏡下併用右肺上葉部分切除施行後ICU入室となった。切除組織からはY字型に分岐する菌糸を認めた (Fig. 2C)。状態が安定していたため翌日の第5病日ICUから一般病棟へ帰室した。第7病日から38°C~39°C台の熱発があり、第13病日には頭痛も出現し、以後も連日頭痛が続いた。第16病日昏睡状態になり、水頭症に対して緊急脳室ドレナージが施行された。ドレナージ術前に施行された頭部MRI検査では脳室の拡大とともに炎症部位は散在性に高輝度の所見として描出されていた (Fig. 2D)。ICU再入室後は人工呼吸器を使用しながら意識レベルの改善を図るべく集学的治療が再開された。抗菌薬としては、経験的治療としてパニペネム (PAM)、アシクロビル (ACV)、アムフォテリシンB (AMPH) の3剤が投与されたが、感染をコントロール

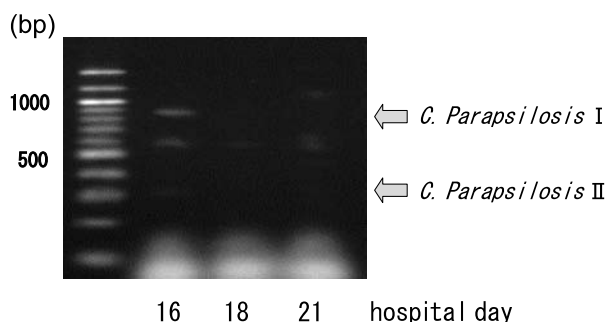


Fig. 4. PCR amplifications and agarose gel electrophoresis

Cerebrospinal fluid (CSF) collected from case 6 were assayed. Positive bands for *C. parapsilosis* I and II were shown only in the lane corresponding to the CSF on 16th hospital day.

できず第28病日に他界した (Fig. 3)。起炎菌検索のために、培養検査、血清学的検査、遺伝子診断などの各種検査を実施した。培養検査と血清検査ではいずれも陰性であった。髄液のPCRでの *Candida parapsilosis* が唯一の陽性所見であった (Fig. 4)。



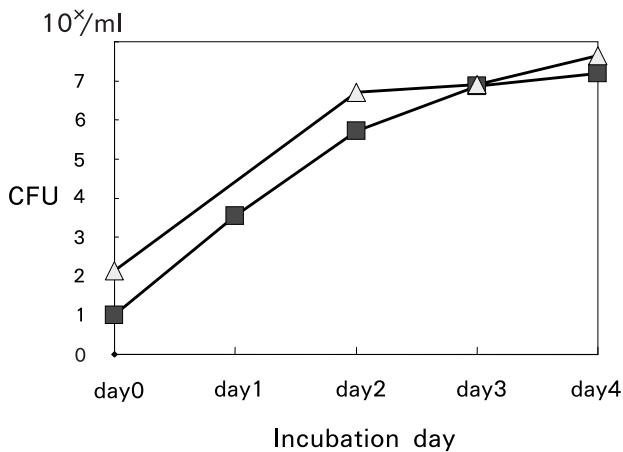


Fig. 5. Culture of *C. albicans* (AMI 4)

Fungus fluid was calibrated to 10/ml (squares) and 100/ml (triangles). They grew rapidly up to 10<sup>5</sup>~10<sup>6</sup>/ml during two days in the GYEP medium kept at 30°C.

## II) 感度を上げるための工夫

(1) 10個/mlと100個/mlのAMI4株はそれぞれ30°Cの恒温槽のなかでは48時間程度で10<sup>5</sup>~10<sup>6</sup>/ml程度まで増殖してその後は頭打ちになった (Fig. 5).

(2) 上記結果を踏まえて血液検体採取量に制限のある小児6名を対象として培養後のPCRの有用性を調べた。男児5人、女児1例で平均年齢6.83±4.71, 平均体重22.18±13.26 kgであった。基礎疾患の内訳は急性骨髄性白血病2例, 急性リンパ性白血病2例, 再生不良性貧血症2例でいずれも, 骨髄移植実施後に深在性真菌症の発症が疑われた症例であった。採取血液から遺伝子検査を実施したところ20検体中10検体で陽性であった。起炎真菌としては *C. albicans* が殆どであった。さらに陰性であった4検体を36°C 48時間の培養後に同じ検査を実施したところ1検体で陽性となった (Fig. 6)。

## 考 察

集中治療室での深在性真菌症の診断は, 一般的に困難である。臨床症状に加えて, 画像検査, 血液生化学検査, β-Dグルカン値, 培養検査を総合的に判断して診断することがスタンダードになっている。集中治療室の性格上, 病状の安定した症例は退室することになり, 基本的にはあまり時間的余裕のない症例が治療対象となっている。また血清診断に影響を及ぼすような, γグロブリン製剤の投与や血液透析などは, 重症感染症例ではしばしば実施されている治療手技であり評価に際して気をつけたいといけないうことである。

真菌遺伝子検査は, 臨床検体から抽出した真菌DNAの特異的部分のみを増幅させることで, 真菌の属や種のレベルまでの同定が可能なのが優れている。今回用いたプライマー群はDNA topoisomerase II 遺伝子から解析作成されたものであり<sup>3)</sup>, 特にPs VIは, *C. albicans*, *C. parapsilosis* I and II, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *Aspergillus fumigatus* の2属6種の真菌を同時同定<sup>4)</sup> できることが

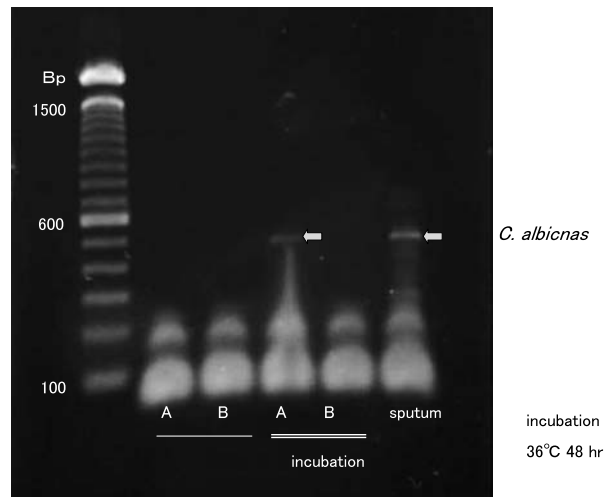


Fig. 6. DNA amplification by the incubation

After two days incubation a pathogen was revealed by multiplex PCR.

A: anaerobic culture bottle B: aerobic culture bottle

ら日常臨床で使用するのに非常に適したプライマー構成となっている。今回の8例の結果からは複数の真菌の混合感染が生じる状況は, WBCやCRPといった炎症所見はむしろ高くなっており, 細菌感染の存在が影響したためと考えられた。また真菌の混合感染とSOFAスコアによる多臓器障害の指数には明確な差異はなかったが, 余命日数に差異がでたことは, 抗真菌薬投与開始の基準を考える上で示唆に富む結果と考えられた。検体採取曜日を揃えることで症例や検体数に偏りのない形を出来るだけとったがもう少し症例数を重ねる必要がある。

PCRの感度を上げるためにはいろいろな工夫が試みられており報告もされている。深在性真菌症そのものがそれほど頻度が高いわけではないので, 遺伝子診断は白血球減少症例, ステロイドや免疫抑制剤投与患者, 臓器移植症例, 多臓器不全症例に加えて長期の抗生物質の投与, 1週間以上持続する発熱, β-Dグルカン値の上昇などが認められた症例を選んで検査することが現実的と思われる。今回1日から2日の培養により真菌を増菌してからPCRを実施してみたが, 理論的には感度を上げることが期待されるので, 小児など検体採取量に制限のある症例には有効と思われる。

追記: 上記の内容は第49回日本医真菌学会総会 (2005年10月7日, 幕張) のワークショップ: 外科, 救急, 集中治療領域における真菌感染症の現状と対策で発表した。

## 文 献

- 1) 深在性真菌症のガイドライン作成委員会編: 救急・集中治療領域. 深在性真菌症の診断・治療ガイドライン, pp.31-34, 医歯薬出版, 東京, 2003
- 2) Moreno R, Vincent JL, Matos R, et al.: The use of maximum SOFA score to quantify organ dysfunction/

- failure in intensive care. Results of prospective, multicenter study. *Intensive care Med* **25**: 686-696, 1999.
- 3) Kanbe T, Hori T, Arishima T, *et al.*: PCR-based identification of pathogenic *Candida* species using primer mixes specific *Candida* DNA topoisomerase II genes. *Yeast* **19**: 973-989, 2002.
- 4) Kanbe T, Arishima T, Hori T, *et al.*: Improvements of PCR-based identification targeting the DNA topoisomerase II Gene to determine major species of opportunistic fungi *Candida* and *Aspergillus fumigatus*. *Microbiol Immunol* **47**: 631-638, 2003.

## Use of PCR Based Diagnosis for Common Invasive Fungal Infections in the Intensive Care Unit

Takuro Arishima, Jun Takezawa

Intensive Care Unit, Nagoya University Hospital  
65 Turumai-cho syouwa-ku, Nagoya 466-8550, Japan

Deep-seated *Candida* infections and invasive aspergilloma are becoming a serious problem for individuals who need intensive care. The laboratory diagnosis of such infections is sometimes delayed due to relatively slow growth of these yeasts from clinical specimens. Several studies seem to indicate that early detection of deep-seated and invasive fungal infections is possible using genomic amplification methods. In the present study, we used a novel PCR assay that can assay five clinically common species (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, and *A. fumigatus*) simultaneously. We evaluated the utility of this PCR based diagnosis with seven patients with candidiases.

This assay is more sensitive than the culture result in 26 clinical samples. ( $\chi^2=5.16$ ,  $p<0.05$ ) In the clinical course of each patient, the number of detected fungal species gradually increased. More than two species were detected from single or several clinical specimens, and these patients would die within 14 days compared with the 61 day period individuals with zero or one species would live. ( $p<0.005$ ) Before super infections of fungus, an antifungal drug could be applied to a suspected patient in the ICU.

To improve sensitivity of this diagnosis from blood samples, we evaluated them after one day incubation at 34°C. We found a PCR product in 10 of 20 blood samples taken from five children after bone marrow transplantation. One of four negative samples became positive after more than 48 hours of incubation.

---

この論文は、第49回日本医真菌学会総会の“ワークショップ：外科、救急・集中治療領域における真菌感染症の現状と対策”において発表されたものです。