

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

長崎大学第2内科

光武耕太郎	河野 茂	松田 治子	吉富 祐子
宮崎 義継	東山 康仁	田中 研一	岩本 雅典
前崎 繁文	賀来 満夫	古賀 宏延	原 耕平

(平成4年1月13日受付)

(平成4年1月23日受理)

Key words: candidiasis, latex agglutination test,
mannan, Cand-Tec®

要 旨

マウス感染モデルを用いて、深在性カンジダ症における血中カンジダ抗原の検出をCand-Tec®およびマンナン抗原検出用ラテックス凝集テストにより検討した。*Candida albicans*の尾静脈接種により作製したマウス播種性カンジダ症において、感染2時間後には、マンナン抗原は全例で陽性となったが、感染2～3日後には臓器内菌数の減少に伴い陽性率は一時低下し(29%)、4日後より再び全例陽性となった。一方、Cand-Tec®ではマウス血清はすべて陽性を示したため、2倍希釈以上で凝集した場合を陽性としたところ、抗原の検出率はマンナン抗原の検出法に比べ低率であった(12時間で50%、24時間で10%、6日目で25%)。また、*C. albicans*を経口的に接種し、消化管内に定着させた後、免疫抑制剤を投与したマウスでは、糞便中のカンジダの増加に伴い血中のマンナン抗原が陽性となり、やや遅れて血液からもカンジダが分離され、Cand-Tec®も陽性となった。なお、Cand-Tec®は培養菌液や破砕した菌体成分では凝集を示さず、宿主により修飾された抗原を検出している可能性が示唆された。

序 文

深在性真菌症は増加傾向にあり、特にカンジダ症の占める割合は高く、臨床上問題となっている¹⁾。深在性カンジダ症の主たる原因真菌である*Candida albicans*は口腔や消化管などに常在しており、本来無菌的でない検体からの本菌の分離は、必ずしも感染症を意味しない。このように定着と感染の鑑別など、臨床診断は困難であるが、補助診断法として種々の血清学的検査法が開発され²⁾、抗原の経時的な変化によって治療効果や予後の判定に利用できることも示唆された³⁾。しかし、深在性カンジダ症において抗原が血中に認められるのは一過性であり、その検出はしばしば困難とされる⁴⁾。今回我々は実験のマウスカンジダ

症モデルを用いて、経時的にラテックス凝集テスト(LA)による抗原検出および各臓器(心臓、肝臓、腎臓、脾臓)における生菌数の測定を行い、二種のカンジダ抗原検出法の有用性を比較検討したので報告する。

材料と方法

1. マウス播種性カンジダ症における抗原の検出

サブロー寒天培地にて30℃、48時間培養した*Candida albicans* IFM4009株を滅菌生食水にて 1.5×10^7 CFU/mlに調整し、BALB/c 5週齢の雄(各1群10匹)に尾静脈より0.1mlを静注し、播種性カンジダ症を作製した。静注後2、12時間および1、2、3、4、5、6、7日目に脱血屠殺して得た血清を56℃で15分間プロナーゼ処理し、5分間煮沸した後、抗マンナンポリクロナル抗体

別刷請求先(〒852)長崎市坂本町7-1

長崎大学医学部第2内科 原 耕平

で被覆したマンナンラテックス凝集テスト（極東製薬より分与，Lot No. 004）と，Cand-Tec®（Ramco. Lab 社製）を用いカンジダ抗原を測定した。マウス血清と試薬を1：1の割合で反応させた凝集を観察した。陽性を示したものは段階希釈を行い，凝集を示す最大希釈倍数を抗原価とした。また24，72時間後，4，5日目に血液培養と各臓器（心臓，肝臓，腎臓，脾臓）におけるカンジダの生菌数を測定した。対照として *Cryptococcus neoformans* YC-11株を 1.7×10^7 ，*Aspergillus fumigatus* TIMM1335株， 4.0×10^6 を尾静脈より注入し，接種後5ないし7日目の感染マウス血清において，上記ラテックス凝集反応を行った。

2. カンジダ経口感染マウスにおける抗原の検出

BALB/c 5週齢の雄にあらかじめクロラムフェニコール5mgを1回，ゲンタマイシン1日1mgを3日間経口投与後，*Candida albicans* IFM40009株 1×10^6 CFU/mlを週1回2週間経口的に接種した後，4週目よりサイクロフォスファミド2mgを週3回1週間腹腔内投与し，免疫抑制マウスにおけるカンジダ感染モデルを作製した。またクロラムフェニコール5mg，ゲンタマイシン1mgを実験経過中5週間それぞれ隔日に経口投与した。血中抗原の検出はマンナンラテックス凝集テストおよびCand-Tec®にて測定した。また血液培養とともに代謝ケージを用いて，糞便培養を同時に施行した。

3. カンジダ菌体および上清におけるラテックス凝集反応

C. albicans IFM40009株をSabouraud dextrose brothにて37℃，24時間培養後， 1×10^7 CFU/mlに調整し，10倍段階希釈した菌液，および3,000rpmで5分間遠沈後の培養上清を用いて，マンナンラテックス凝集反応およびCand-Tec®によるカンジダ抗原の検出を試みた。同時に減菌チューブに減菌生食水とガラスビーズを入れ，*C. albicans*を加えた後約10分間強く攪拌し，カンジダの破碎を顕微鏡で確認した検体についても凝集反応を観察した。

成 績

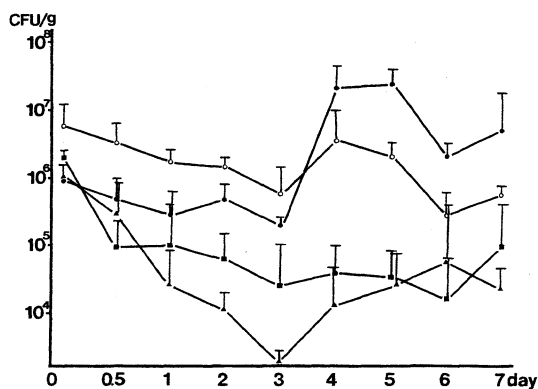
1. マウス播種性カンジダ症におけるカンジダ抗原検出

Cand-Tec®：希釈しない血清ではすべて疑陽性を示したため，2倍希釈以上を陽性とした。カンジダ静注による播種性カンジダ症における抗原検出率をTable 1に示した。Cand-Tec®では，感染12時間後10匹中5匹（50%）に陽性を認めたが，感染24時間後では陽性を示したものはわずか1匹（10%）であった。その後48時間から5日目までは陽性をしめたものではなく，感染6日目に再び8匹中2匹（25%）で陽性となった。マンナンラテックス凝集反応は感染直後より7匹中7匹（100%）で陽性を示したが，Cand-Tec®と同様に2日目，3日目では陽性率が一時低下し，4日目より再び全てのマウスで陽性となった。同時に測

Table 1 *Candida* antigen detection by latex agglutination tests in murine candidiasis infected by intravenous inoculation

Day	Cand-Tec (%)	Mannan-LA (%)	Blood culture (%)	Organ culture	
				spleen (%)	kidney (%)
0.08	0/10 (0)	7/7 (100)		10/10 (100)	10/10 (100)
0.5	5/10 (50)	9/9 (100)		10/10 (100)	10/10 (100)
1	1/10 (10)	7/9 (78)	4/6 (67)	9/9 (100)	10/10 (100)
2	0/10 (0)	2/7 (29)		10/10 (100)	10/10 (100)
3	0/5 (0)	2/7 (29)	1/5 (20)	10/10 (100)	10/10 (100)
4	0/8 (0)	7/7 (100)	1/4 (25)	7/9 (78)	8/9 (89)
5	0/7 (0)	7/7 (100)		8/10 (80)	9/9 (100)
6	2/8 (25)	7/7 (100)		5/8 (63)	9/9 (100)
7	0/7 (0)	5/5 (100)	1/5 (20)	8/9 (89)	9/9 (100)

Fig. 1 The number of *C. albicans* in various organs Kindney (●—●), Spleen (○—○), Heart (■—■), Liver (▲—▲).



定した各臓器の生菌数について Fig. 1 に示した。菌数は感染初期には脾臓で最も多く、12時間後には 3.3×10^6 CFU/g (2.6×10^5 /脾) で、ついで腎臓に 4.7×10^5 CFU/g (7.4×10^4 /腎) と多く認められ、感染3日後まではすべての臓器で菌数は減少した。しかし、4日目より増加傾向を示し、腎臓では 2.4×10^7 CFU/g (5.1×10^6 /腎)、脾臓では 3.9×10^6 CFU/g (2.5×10^5 /腎) と増加した。

血液培養はカンジダ静注24時間後では、6匹中4匹で陽性であったが、72時間では5匹中1匹(20%)と陽性率は低下し、4日目、7日目では各々4匹中1匹のみ陽性であった。

また病理学的には、カンジダ静注2日目でPAS染色にて心臓や腎臓(特に皮質)にカンジダの増殖が認められ、7日目でも腎臓、特に腎盂に炎症細胞を伴う多数の菌糸が認められた。肝臓と脾臓では臓器培養では多数のカンジダが分離されたものの、PAS染色にて菌糸はほとんど見られなかった。

2. 経口接種によるマウスカンジダ症

Table 2 のごとくカンジダの経口接種後、糞便中のカンジダ菌数は、2週目で 3.4×10^3 CFU/g、3週目で 1.5×10^4 CFU/g であったが、血液や臓器からは培養されなかった。しかし、サイクロフォスファマイド投与後の糞便中カンジダ菌数は、4週目で 1.4×10^6 CFU/g、5週目で 8.9×10^5 CFU/g となり、血液培養でも4週目で40% (2/5)、5週

Table 2 Mycological and serological tests in murine candidiasis infected by oral inoculation

Week	Stool culture (log ₁₀ CFU/g)	Blood culture(%)	Cand-Tec (%)	Mannan-LA (%)
0	0	0	0	0
2	3.53 ± 0.53	0	0	0
3	4.80 ± 0.7	0	0	3/5(60)
4	6.15 ± 0.45	2/5(40)	0	2/5(40)
5	5.95 ± 0.35	1/5(20)	3/5(60)	2/5(40)

目で20% (1/5) が陽性となった。抗原検出率は、マンナンラテックス凝集反応では、3週目で60%、4週目および5週目で40% (2/5) の陽性率を示した。

3. カンジダ菌体および培養上清における凝集反応

培養上清や菌液におけるカンジダ抗原の検出では、マンナンラテックス凝集反応が培養上清で強い凝集を示し、菌液では菌量が 1.0×10^4 /ml 以上になると凝集が認められた。それに対して、Cand-Tec®は培養上清および菌液のいずれにも凝集を認めなかった。また破碎した菌体に対してもCand-Tec®は凝集を示さなかった。

考 察

カンジダは口腔や消化管等の常在菌であり、深在性カンジダ症では、特徴的な臨床症状を呈することは少なく、また従来の血液培養では検出率が低い⁵⁾⁶⁾ため、治療に結びつく早期診断は困難なことが多い。そのため補助診断法として、代謝産物や抗原検出など血清学的検査法が試みられ、中でもラテックス凝集反応は簡便な方法として、臨床的にも有用な方法と考えられる。

今回、我々は2種のラテックス凝集法を用いて、マウスカンジダ症におけるカンジダ抗原の検出率の比較を行った。Ramco社製のCand-Tec®では、易熱性の糖蛋白抗原を検出するとされているが、マウスにおける播種性カンジダ症では、カンジダ接種後、臓器内菌数とほぼ相関して血中カンジダ抗原は増減するものの、マンナン抗原を検出するマンナンラテックス凝集反応(極東)に比べ、やや低い検出率であった。GentryらによるCand-Tec®を用いた臨床的検討では、血液培養でカンジダが分離された患者は高い陽性率(91%)

を示したが⁷⁾, Baileyらの報告では28%⁸⁾, Lewieuxの報告では44%と陽性率は低く⁹⁾, NessやPhillipsらも感度や特異性に問題が多く、臨床応用には大きい疑問があると述べている¹⁰⁾¹¹⁾. Greenfieldのラットを用いた実験¹²⁾では、23匹中全てに陰性であり、宮崎らの家兎の実験でも検出率は低く¹³⁾, その理由として、種の違いによるもの、あるいは宿主がカンジダ抗原をprocessしたneoantigenを検出しているのではないかと推定されている。我々の今回の実験でも、カンジダ培養上清や菌液、破碎した菌体いずれでも凝集を認めなかった。また、Gentryがウサギに抗体を作成するために用いた熱処理した抗原菌液そのものに対しても凝集しなかったことは興味深く思われた。それに対して、マンナンラテックス凝集反応はカンジダ細胞壁の主成分のひとつであるマンナンを検出する方法で、深在性カンジダ症の患者血中のマンナン抗原量は0.5ng/ml以下や1,000ng/ml以上などと報告されている^{14)~17)}. マンナン抗原はクリプトコックスの莢膜多糖抗原に比べ、クリアランスが比較的早い¹⁸⁾ため、検出感度に加え検体が採取された時期や、その基礎疾患および重症度が検出率に大きく関係していると考えられている。マウス播種性カンジダ症モデルは致死の実験モデルであるが、カンジダ接種後、臓器内菌数は一時的に減少し、抗原検出率も一時低下した。またヒトのカンジダ症により類似したモデルである経口接種モデルでは、糞便中のカンジダ菌数の増加に伴い血中の抗原が陽性となっており、消化管粘膜からのカンジダの血中およびリンパ管への侵入が起こり、抗原血清が見られたと推定され、経時的な検体の採取や、頻回な検査が深在性真菌症の抗原検出においては重要であることが示唆された。また同じ壁構成成分である(1→3)-D-β-グルカンの測定や、47kDa抗原や抗体、D-arabinitolなどの検出法を組み合わせていることが、血清診断の信頼性をさらに高めるために現状では必要であると考えられた。

文 献

- 1) 奥平雅彦: Opportunistic fungus infectionの病理. 日病会誌, 74: 61—91, 1985.
- 2) Kohno, S.: Serological diagnosis of deep seated mycosis. Asian Med. J., 34: 460—466, 1991.
- 3) 前崎繁文, 河野 茂, 山田 洋, 光武耕太郎, 杉山秀徳, 堀 博之, 賀来満夫, 古賀宏延, 原 耕平, 瀬戸牧子, 豆谷源一郎: カンジダ血症における抗原検出法としての血清診断法の検討. 感染症誌, 65: 1091—1096, 1991.
- 4) Kappe, R. & Muller, J.: Rapid clearance of *Candida albicans* mannan antigens by liver and spleen in contrast to prolonged circulation of *Cryptococcus neoformans* antigens. J. Clin. Microbiol., 29: 1665—1669, 1991.
- 5) Francoise, M.C., Timothy, E.K. & Donald, A.: Fungemia in the immunocompromised host. Am. J. Med., 71: 363—370, 1981.
- 6) 安岡 彰, 河野 茂, 前崎繁文, 山田 洋, 笹山一夫, 宮崎幸重, 賀来満夫, 古賀宏延, 原 耕平: Lysis centrifugationによる血液培養法の真菌検出における基礎的ならびに臨床的検討. 感染症誌, 65: 838—843, 1991.
- 7) Gentry, L.O., Wilkinson, I.D., Lea, A.S. & Price, M.F.: Latex agglutination test for detection of candida antigen in patient with disseminated disease. Eur. J. Clin. Microbiol., 2: 122—128, 1983.
- 8) Bailey, J.W., Sada, E., Brass, C. & Bennett, J. E.: Diagnosis of systemic candidiasis by latex agglutination for serum. J. Clin. Microbiol., 21: 749—752, 1985.
- 9) Lemieux, C., St-Germain, G., Vincelette, J., Kaufman, L. & Repentigny, L.: Collaborative evaluation antigen detection by a commercial latex agglutination test and enzyme immunoassay in the diagnosis of invasive candidiasis. J. Clin. Microbiol., 28: 249—253, 1990.
- 10) Ness, M.J., Vaughan, W.P. & Woods, G.L.: Candida antigen latex test for detection of invasive candidiasis in immunocompromised patients. J. Infect. Dis., 159: 495—502, 1989.
- 11) Phillips, P., Dowd, A., Jewesson, P., Radigan, G., Tweeddale, M.G., Clarke, A., Geere, I. & Kelly, M.: Nonvalue of antigen detection immunoassays for diagnosis of candidemia. J. Clin. Microbiol., 28: 2320—2326, 1990.
- 12) Greenfield, R.A., Trout, D.L., Rickard, R.C. & Altmiller, D.H.: Comparison of antibody, antigen, and metabolite assays in rat models of systemic and gastrointestinal candidiasis. J. Clin. Microbiol., 26: 409—417, 1988.
- 13) 宮崎幸重, 河野 茂, 安岡 彰, 笹山一夫, 山田洋, 道津安正, 山口恵三, 廣田正毅, 原 耕平: 家兎カンジダ症におけるLimulus test, D-

- arabinitol 測定及び Latex 凝集法の比較検討. 感染症誌, 64: 474—478, 1989.
- 14) Lew, M.A., Siber, G.R., Donahue, D.M. & Maiorca, F.: Enhanced detection with an enzyme linked immunosorbent assay of candida mannan in antibody-containing serum after heat extraction. J. Infect. Dis., 145: 45—56, 1982.
 - 15) Hopwood, V., Evans, E.G.V. & Carney, J.A.: A comparison of methods for the detection of candida antigens. Evaluation of a new latex reagent. J. Immunol. Methods, 80: 199—210, 1985.
 - 16) Kahn, W.F. & Jones, J.M.: Latex agglutination tests for detection of candida antigens in sera of patients with invasive candidiasis. J. Infect. Dis., 153: 579—585, 1986.
 - 17) de Repentigny, L., Marr, L.D., Keller, J.W., Kaufman, L. & Reiss, E.: Comparison of enzyme immunoassay and gas-liquid chromatography for the rapid diagnosis of invasive candidiasis in cancer patients. J. Clin. Microbiol., 21: 972—979, 1985.
 - 18) Jones, J.M.: Kinetics of antibody responses to cell wall mannan and major cytoplasmic antigen of *Candida albicans* in rabbits and humans. J. Lab. Clin. Med., 96: 845—860, 1980.
 - 16) Kahn, W.F. & Jones, J.M.: Latex agglutina-

Antigen Detection in the Murine Models of Systemic Candidiasis

Kotaro MITSUTAKE, Shigeru KOHNO, Haruko MATSUDA, Yuko YOSHITOMI,
Yoshitsugu MIYAZAKI, Yasuhito HIGASHIYAMA, Ken-ichi TANAKA,
Masanori IWAMOTO, Shigefumi MAESAKI, Mitsuo KAKU,
Hironobu KOGA & Kohei HARA

Second Department of Internal Medicine, School of Medicine, Nagasaki University

We compared two latex agglutination tests for serum candidal antigen in murine models of systemic infection and gastrointestinal colonization. In the intravascular-infection model, mannan detection test was positive at 2 hours after inoculation, but Cand-Tec was less sensitive than mannan detection test in this model.

In the gastrointestinal colonization model followed by systemic infection in neutropenic mice, the mannan antigen test became positive after 3 weeks of colonization with increased number of *Candida* of the stool, and Cand-Tec became positive after 5 weeks in neutropenic mice.