

## 論文内容の要旨

Basic verification of  $\beta$ -D glucan in leukocyte-rich plasma for the diagnosis of deep mycosis

(深在性真菌症診断のための多白血球血漿における  $\beta$ -D glucan の基礎的検証)  
(下山賢, 菅重典, 高橋学, 森野豪太, 山田裕彦, 井上義博, 稲田捷也, 遠藤重厚)  
(Journal of Infection and Chemotherapy 53 巻, 令和3年3月掲載)

## I. 研究目的

深在性真菌血症の血清補助検査は、本邦で保険適応されている  $\beta$ -D glucan (以下 BDG) が選択されることが多い。測定法にはワコー法やファンギテック G テスト MK 法 (以下 MK 法)、マルハ法などがあるがカットオフ値により様々な検査精度の報告がある。現行法は検体材料として、遠心分離した血漿である多血小板血漿 (Platelet-Rich-Plasma 以下: PRP) を用いているが、真菌は白血球に結合または貪食されるため、血漿のみを測定する事となり、菌体の BDG 量を測定しているとは言い難く偽陰性の要因となる。また、アルブミン製剤投与や医療資材汚染などの要因により偽陽性となることが知られている。この度、血球分離剤であるヒドロキシエチルデンプン製剤 (以下 HES 製剤) を用い赤血球のみを沈降させ、多白血球血漿 (Leukocyte-Rich-Plasma: LRP) を作成し、血漿および真菌成分を含んだ白血球の BDG 量を測定し偽陰性を抑え、PRP と LRP の BDG 量を比較することで偽陽性検体との鑑別を可能にし、深在性真菌症の診断率向上が可能であると考えた。

## II. 研究対象ならび方法

①HES 製剤そのものに非特異的反応による偽陽性がないことを確認②HES 製剤を健常血液と混和させ LRP における偽陽性はないことを確認③in vitro における偽陽性検体と真の陽性検体を作成し、それぞれ PRP-LRP 間の BDG 量を比較検証し基礎的検討をする。

1. HES 製剤のみの BDG 量の検討  
HES 製剤 0.1ml に直接前処理を加え、ワコー法を用いて BDG 量を測定した。
2. 健常者血液における PRP, LRP の BDG 値の検討  
ボランティア健常者 (n=10) の全血 0.5ml を用い PRP と LRP それぞれの BDG 量を測定し比較した。
3. アルブミン製剤混和血液における PRP-LRP 間の BDG 値の比較  
ボランティア健常者 (n=10) のヘパリン加全血 0.49ml にアルブミン製剤 0.06ml (25% 赤十字アルブミン: 赤十字社) を 37.0°C で 2 時間混和させた。その後、PRP 法, LRP 法をそれぞれ行い BDG 量を測定し比較した。
4. ガーゼ絞り液添加血液における PRP-LRP 間の BDG 値の比較

ボランティア健常者 (n=10) のヘパリン加全血 0.49ml にガーゼ絞り液 0.01ml を 37.0℃で 2 時間混和させた。その後、PRP 法、LRP 法をそれぞれ行い BDG 量を測定し比較した。

5. 真菌混和血液における PRP-LRP 間の BDG 値の比較  
ボランティア健常者 (n=10) のヘパリン加全血 0.49ml に、調整した濃度の真菌液 0.01ml を 37℃で 2 時間混和させた。その後、PRP、LRP それぞれの BDG 量を測定し比較した。
6. BDG-ratio の比較検討  
BDG-ratio は LRP-BDG 値を PRP-BDG 値で除した値と定義した。ここでは結果 3.4.5 における BDG-ratio を算出し比較した。
7. 白血球数及び真菌貪食増数の比較  
真菌混和血液における PRP と LRP をそれぞれ 10 $\mu$ L ずつ採り、グラム染色し検鏡した。検鏡による白血球数および真菌貪食像数を目視確認でカウントし、各々比較した。

### III. 研究結果

1. HES 製剤のみでの BDG 量  
HES 製剤のみでは全て低値であり、異常高値は認められなかった。
2. 健常者における PRP と LRP の BDG 値の比較検討  
健常者血液における PRP-LRP 間に有意差はなく、異常高値は認められなかった。
3. アルブミン製剤混和血液における PRP-LRP 間 BDG 値の比較検討  
アルブミン製剤混和血液における PRP-LRP 間の BDG 値に有意差は認められなかった。
4. ガーゼ絞り液添加血液における PRP-LRP 間 BDG 値の比較検討  
ガーゼ絞り液添加血液における PRP-LRP 間の BDG 値に有意差は認められなかった。
5. 真菌混和血液における PRP-LRP 間 BDG 値の比較検討  
真菌混和血液における PRP-LRP 間では LRP の BDG 値が有意に高値であった。
6. BDG-ratio の算出と比較  
結果 3.4.5. から BDG-ratio を算出すると、アルブミン混和血液・ガーゼ絞り液添加血液ではそれぞれ  $0.99 \pm 0.04$ ,  $1.10 \pm 0.22$  であったが、真陽性検体では  $1.83 \pm 0.36$  となった。真陽性検体での BDG-ratio が偽陽性検体と比較し優位に高値であった。
7. 真菌混和血液における PRP と LRP 検体検鏡による真菌貪食像数の比較検討  
真菌混和血液における PRP と LRP をグラム染色し検鏡すると、LRP は PRP に比べ真菌成分・白血球成分を多く含み、白血球の貪食像もより多く認められた。

### IV. 結 語

PRP, LRP 単独の測定は白血球の真菌貪食の有無に関わらず、偽陽性要因を含めば陽性値となり、実臨床では判断が難しい。しかし PRP と LRP を両方測定し BDG-ratio を算出すると、真菌混和血液と偽陽性検体であるアルブミン混和血液、ガーゼ絞り液混和血液との間で有意差が生じた。深在性真菌症において、LRP 検体による BDG 測定は偽陰性要因を解消し、また、LRP と PRP を同時測定し BDG-ratio を算出することで偽陽性要因を解消し、実臨床においてより高精度となる可能性がある。今後、臨床研究を進め成果を報告予定である。

## 論文審査の結果の要旨

### 論文審査担当者

主査 教授 鈴木 啓二郎 (臨床検査医学講座)

副査 教授 下沖 収 (救急・災害・総合医学講座：総合診療医学分野)

副査 教授 鈴木 健二 (麻酔学講座)

深在性真菌症の多くは宿主免疫力の低下による日和見感染で、臨床所見は一様でなく、早期診断は難しい。1990年代に本邦で開発された血清・血漿中(1→3)-β-D-グルカン(BDG)測定は有用な血清補助診断である。BDGは本疾患の診断・治療効果判定に測定されるが、その際には偽陽性や偽陰性が問題となる。本研究は、通常のBDG測定には血小板富血漿(PRP)が用いられるため(PRP-BDG)、白血球に付着・貪食された真菌のBDGは反映され難く、偽陰性の要因となることを指摘した。そのため、ヒドロキシエチルデンプン(HES)で多白血球血漿(LRP)を分離して、そのBDGの測定(LRP-BDG)を考案した。さらにPRP-BDGと比較(LRP-BDG/PRP-BDG=BDG-ratio)することで偽陰性および偽陽性を抑える評価方法を考案し、その基礎的検証を行った。また、偽陽性と関連するアルブミン製剤やガーゼが本法に与える影響も検討した。

アルブミン製剤添加健常人血液、ガーゼ絞り汁添加健常人血液のPRPおよびLRPのBDG値は健常人血液BDGと比較して高値であったが、両者で有意差はなかった。しかし、真菌混和健常人血液では、PRPと比べLRPのBDG値が有意に高値だった。アルブミン製剤添加、ガーゼ絞り汁添加、真菌混和健常人血液のBDG-ratioは真菌混和健常人血液で有意に高値だった(0.99±0.04, 1.10±0.22 vs. 1.83±0.36)。

本論文は、LRP-BDGの測定で偽陰性を、BDG-ratioの算出で偽陽性を抑制する評価方法の貴重な基礎的知見を示した。また、簡便な方法で検査対象となる血球分画(LRP)を得ることで、深在性真菌症の診断精度を向上させ得る有用な知見を示した。本論文は学位に値する。

### 試験・試問の結果の要旨

審査では、研究の背景、方法、結果、および考察をスライドで明確に示し、研究手法や結果の解釈に関する諮問(BDG測定方法や統計学的手法とその解釈など)を行い、適切な回答を得た。学位に値する学識を有していると考えられる。また、学位論文の作成にあたって、剽窃・盗作等の研究不正は無いことを確認した。

### 参考文献

- 1) Polymyxin B immobilized fiber-direct hemoperfusion を施行した敗血症性ショック患者における nuclear matrix protein の推移(野々口マリア、他 20 名と共著)  
エンドトキシン血症救命治療研究会誌, 23 巻 1 号(2019):p190-196.
- 2) Polymyxin B immobilized fiber-direct hemoperfusion を施行した敗血症性 acute respiratory distress syndrome における II 型 phospholipase A2 と surfactant protein D の検討(佐藤正幸、他 22 名と共著)  
エンドトキシン血症救命治療研究会誌, 22 号 1 巻(2018 年):p223-231.