

●原 著

血清アスペルギルス沈降抗体検査症例の臨床的検討

安藤陽一郎^a 北里 裕彦^{b,c} 田尾 義昭^b 松永 和子^c 伊勢 信治^b
高田 昇平^b 久保田 緑^a 星野 友昭^c 川崎 雅之^b 相澤 久道^c

要旨：2009年2～12月に国立病院機構福岡東医療センターで*Aspergillus immunodiffusion system* (Microgen Bioproducts Ltd., UK) のキットを用いて血清アスペルギルス沈降抗体検査を施行した症例について、沈降線を認めた症例（「あり」例）における沈降線数や診断名、また偽陽性や偽陰性の頻度などについて検討した。「あり」例 24 例中、沈降線数が 2 本以上を示した 21 例のうち 16 例は慢性肺アスペルギルス症（chronic pulmonary aspergillosis : CPA）であったが、偽陽性が疑われる症例を 4 例認めた。沈降線を認めなかった症例 99 例中 85 例が非アスペルギルス症症例であったが、初回検査時に偽陰性を示した CPA 症例も 4 例みられた。非アスペルギルス症を対照とした CPA における本検査について、陽性判定基準を沈降線数 2 本以上とすれば感度 78.9%、特異度 95.6% など最良の結果を示した。

キーワード：アスペルギルス沈降抗体、肺アスペルギルス症、感度、特異度

Aspergillus precipitating antibody, Pulmonary aspergillosis, Sensitivity, Specificity

緒 言

肺アスペルギローマ（pulmonary aspergilloma : PA）など、慢性肺アスペルギルス症（chronic pulmonary aspergillosis : CPA）の臨床診断における、血清アスペルギルス沈降抗体検査の有用性はすでに国内外で認識されている^{1)~8)}が、我が国では本検査が保険適応外のためか、その陽性判定基準や検査精度についてのデータは少ない。今回我々は、国立病院機構福岡東医療センター臨床検査部において血清アスペルギルス沈降抗体検査を施行した症例における臨床的検討を行った。

目的と方法

目的：血清アスペルギルス沈降抗体検査の陽性判定基準や検査精度について自験例を用いて検討し、陽性と判定すべき沈降線の数や、結果判定上の注意点などについて明らかにする。

対象と方法：当院において、血清アスペルギルス沈降抗体検査結果における沈降線数の記録を開始した 2009 年 2 月から同年 12 月にかけて、本検査を施行した症例

を集積しレトロスペクティブに検討した。

血清アスペルギルス沈降抗体検査：血清中の *Aspergillus fumigatus* に対する抗体（主に IgG）を二重拡散法によって検出するものであり、検査キットとして *Aspergillus immunodiffusion system* (Microgen Bioproducts Ltd., UK) を使用した。Fig. 1 に示すように、検査プレートのウェルの中央部に患者血清を、①～⑥の部位にマニュアルに従って濃度調整した *A. fumigatus* 抗原試薬を、C1～C3 に陽性および陰性コントロールを注入し、約 48 時間インキュベートの後、検査技師が目視判定し沈降線の数を確認した。

本研究における主な評価項目は、①検査時に沈降線を認めた症例（「あり」例）における、沈降線の本数と診断名との対比、ならびに検査偽陽性症例の検討、②沈降線を認めなかった症例（「なし」例）についての検討、特に検査結果が偽陰性を示した症例の評価、③非アスペルギルス症症例を対照とした CPA 症例の初回検査時における本検査の感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率の評価、とした。

なお CPA は PA、慢性壊死性肺アスペルギルス症（chronic necrotizing pulmonary aspergillosis : CNPA）に大別し、その診断は本邦の深在性真菌症ガイドライン⁷⁾の記述や、Kitasato⁸⁾、Camuset⁹⁾による CPA 診断基準、Kohno^らによる CNPA の診断基準¹⁰⁾に基づき患者主治医により行われ、さらに診断の妥当性について後日、それぞれの著者らにより再評価された。

連絡先：北里 裕彦

〒811-3195 福岡県古賀市千鳥 1-1-1

^a 国立病院機構福岡東医療センター臨床検査部

^b 同 呼吸器内科

^c 久留米大学医学部内科学呼吸器・神経・膠原病内科部門
(E-mail: kita-sir1028@jcom.home.ne.jp)

(Received 28 Feb 2011/Accepted 25 Aug 2011)

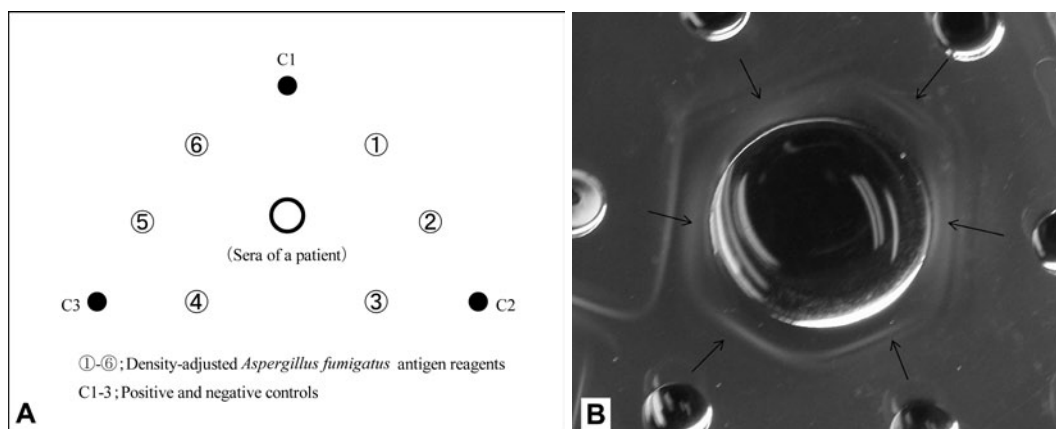


Fig. 1 *Aspergillus* precipitating antibody testing. (A) A summarized figure of the *Aspergillus* immunodiffusion system. (B) A typical example of a positive result for an *Aspergillus* precipitating antibody. Six precipitation arcs (arrows) are visible.

Table 1 Number of the precipitation arcs of 24 patients with positive results of *Aspergillus* precipitating antibody and their characteristics

Number of precipitation arcs	Number of patients	Patient disease
1	3	CPA (during antifungal therapy): 1* Bronchial asthma: 1 Middle lobe syndrome: 1
2	2	CPA (PA): 2
3	11	CPA: 7 (PA 3, CNPA 4**) Nontuberculous mycobacterium: 2 Bronchial asthma: 1 COPD and bacterial pneumonia: 1
4	4	CPA: 3 (PA 1, CNPA 2) ABPA: 1*
6	4	CPA: 4 (PA 2, CNPA 2)

CPA, chronic pulmonary aspergillosis; PA, pulmonary aspergilloma; CNPA, chronic necrotizing pulmonary aspergillosis; ABPA, allergic bronchopulmonary aspergillosis. *These patients were excluded from the statistical analysis. **One patient had a negative result at the first testing, and he was incorporated into the false-negative group.

結 果

1. 集積症例数

前述の期間中に本検査を施行した症例数は、計 117 症例、141 回分（沈降線「あり」例：24 例 29 回分、「なし」例：99 例 112 回分、重複症例含む）であった。

2. 各種検討結果

1) 「あり」例 24 例の初回陽性時における、沈降線の本数と診断名との対比 (Table 1)

認められた沈降線の本数は、1 本：3 例、2 本：2 例、3 本：11 例、4 本：4 例、6 本：4 例であった。沈降線数が 1 本の症例 3 例については、抗真菌薬投与中の CPA 1 例（後述の統計学的処理からは除外）を除けば喘息 1 例、中葉症候群 1 例と、いずれも CPA やアレルギー性気管支肺

アスペルギルス症 (allergic bronchopulmonary aspergillosis: ABPA) などの肺アスペルギルス症を示唆する所見を認めず、偽陽性例と判断した。沈降線数が 2 本の症例は 2 例とも CPA (PA) であり、沈降線数が 3 本以上を示した症例 19 例中、CPA が 14 例 (PA 7 例、CNPA 7 例)、ABPA が 1 例（後述の統計学的処理からは除外）であった。ただし、CNPA の 1 例は以前の 2 回の検査では検査陰性であったものが陽性化した症例であり、後述の「偽陰性例」に組み入れた。また残る 4 例は、喘息 1 例、非結核性抗酸菌症 (nontuberculous mycobacterial infection: NTM) 2 例、慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease: COPD) に合併した細菌性肺炎 1 例であり、検査結果の偽陽性、もしくはアスペルギルス属菌の一時的感染とその自然治癒を

Table 2 Characteristics of 99 patients with negative results of *Aspergillus* precipitating antibody

Number of patients	Patient profile
85	No <i>Aspergillus</i> -related diseases
7*	CPA (during or postantifungal therapy)
3**	Nonaspergillosis patients who had positive results at the first testing
4	Patients with CPA (PA: 1, CNPA: 3) who had false-negative results at the first testing

*These patients were excluded from statistical analyses. **These patients were incorporated into the false-positive group.

Table 3 Statistical analysis of serum *Aspergillus* precipitating antibody testing

	Antibody (+)	Antibody (-)	Total
Positive judgment criteria \geq one precipitation arc			
CPA	15	4	19
Nonaspergillosis	6	85	91
Total	21	89	110

Sensitivity	78.9%		
Specificity	93.4%		
Positive predictive value	71.4%		
Negative predictive value	95.5%		
Positive judgment criteria \geq two precipitation arcs			
CPA	15	4	19
Nonaspergillosis	4	87	91
Total	19	91	110

Sensitivity	78.9%		
Specificity	95.6%		
Positive predictive value	78.9%		
Negative predictive value	95.6%		
Positive judgment criteria \geq three precipitation arcs			
CPA	13	6	19
Nonaspergillosis	4	87	91
Total	17	93	110

Sensitivity	68.4%		
Specificity	95.6%		
Positive predictive value	76.5%		
Negative predictive value	93.5%		

みていた可能性が疑われた（ただし、病変が小さいか他疾患にマスクされ、持続的感染がすでに成立している可能性も否定はできない）が、後述の統計学的処理においては「偽陽性例」に組み入れた。

2) 「なし」例 99 例について (Table 2)

症例中、後日の再検討の結果、真の陰性（非アスペルギルス症）と考えられたものは 85 例であり、治療中もしくは治療後の各種肺アスペルギルス症も 7 例みられたが、後述の統計学的処理からは除外した。また前述の偽陽性症例の経過中陰転化をみたものが 3 例（1 例：初回検査時の沈降線 1 本、2 例：沈降線 3 本）あったが、これも偽陽性症例に結果を包括させた。

本検査が偽陰性を示したと考えられたものは 4 例（PA 1 例、CNPA 3 例）認められ、うち 2 例（PA、CNPA 各 1 例）は経過中の検査陽転化を認めたものの、CNPA

2 例については陰性的のまま現在まで経過観察中である。

3) 非アスペルギルス症症例を対照とした、CPA 症例の初回検査時における本検査の感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率の評価 (Table 3)

前述の症例群から、①同一症例の 2 回目以降の複数回検査分、②検査時すでに治療中もしくは治療後の CPA 症例、③ ABPA 症例を除外し、①未治療・初回検査時の CPA 症例、②非アスペルギルス症と考えられた症例の 2 種に大別して再集計を行った。

その結果としては、CPA 症例 19 例（PA 9 例、CNPA 10 例、[沈降抗体検査結果] 沈降線なし：4 例、沈降線数 2 本：2 例、3 本以上：13 例）、非アスペルギルス症と考えられた症例 91 例（[沈降抗体検査結果] 沈降線なし：85 例、沈降線数 1 本：2 例、3 本以上：4 例）、計 110 例となった。沈降線数 1 本以上をすべて陽性と判定

した場合の感度, 特異度, 陽性的中率, 陰性的中率を算出すると, 感度 78.9%, 特異度 93.4%, 陽性的中率 71.4%, 陰性的中率 95.5%となった. また陽性判定基準を沈降線数 2 本以上に設定した場合の値はそれぞれ, 78.9%, 95.6%, 78.9%, 95.6%, 3 本以上を陽性とする場合 68.4%, 95.6%, 76.5%, 93.5%となった. 以上の結果より, 陽性判定基準は沈降線数を 2 本以上とするのが妥当と考えられた. なお, この陽性判定基準において, 初回検査時における本検査の陽性率を疾患別に表すと, PA で 88.9% (8/9), CNPA で 70% (7/10) であった.

考 察

慢性肺アスペルギルス症 (CPA) は, 肺結核後遺症, COPD, 気管支拡張症など既存の肺疾患, あるいは糖尿病, アルコール依存症, 慢性肝疾患, 全身性ステロイド投与などの免疫状態低下が基盤に存在する患者に発症し, 空洞形成, 菌球, 浸潤影, 胸膜肥厚像など多彩な画像所見を呈する疾患であり⁴⁾⁷⁾, 日本における深在性真菌症の診断・治療ガイドライン (2007 年版)⁷⁾では, CPA は肺アスペルギローマ (PA) と慢性壊死性肺アスペルギルス症 (CNPA) の 2 種類に大別されている. CPA 症例では真菌の微生物学的証明がしばしば困難であり^{7)8)11)~13)}, アスペルギルス抗体やアスペルギルス抗原による血清学的診断に頼らざるをえないケースも多い. CPA の臨床診断における, 血清アスペルギルス沈降抗体検査の有用性については以前より認識されており^{1)~7)}, 近年我々も, CPA 患者における血清アスペルギルス沈降抗体検査の陽性率が, アスペルギルス抗原のそれより優れていることを報告した⁸⁾. しかし我が国において本検査ははまだ保険適応でなく, その陽性判定基準や検査精度について本邦のデータは少ない. かつて Coleman らは, 30 人の PA 患者を含む計 60 人の各種肺アスペルギルス症患者における血清アスペルギルス沈降抗体検査の陽性率は 82%, 特に PA では 93% に達すると報告した²⁾. Kurup らは, 17 人の PA 患者を含む計 75 人の血清を沈降抗体法など 4 種類のアスペルギルス抗体検査法にて測定し, いずれの検査においても各種肺アスペルギルス症における陽性率は 90% 前後であったと報告した³⁾. また上記 17 人において, 沈降抗体検査では全員が強陽性を示し, 一方で検査結果が弱陽性にとどまった症例についてはその多くが非アスペルギルス症症例であった. 今回我々が使用した検査キットである *Aspergillus immunodiffusion system* は, これらの論文の検査技法に準拠したものであり, アスペルギルス沈降抗体の検査方法としても, キット化され手技の標準化がなされていること, 市販されているため入手が比較的容易であること, 海外におけるエビデンスが存在することなどの利点を有している. なお,

本邦における血清アスペルギルス沈降抗体の検査手技や CPA 患者における陽性率について, 池本らがかつて PA における血清アスペルギルス沈降抗体検査の陽性率は 80% 以上であったと報告した⁵⁾. 最近の報告では, 小川らも CPA 患者における血清アスペルギルス沈降抗体検査の陽性率は約 80% であったと述べている⁶⁾. ただし本邦報告例では, 検査手技や陽性判定基準に関する記載が明確でなかったり, 手技の標準化がなされていないなどの問題があり, 手技が標準化された検査キットを用いての血清アスペルギルス沈降抗体検査についての詳細な報告は, 我々が検索しえたかぎり本邦ではこれまでみられない. 今回の研究の結果, 本キットの陽性判定基準を沈降線数 2 本以上に設定した場合に感度 78.9%, 特異度 95.6% など最良の結果が得られることが示唆された.

本研究はレトロスペクティブな調査に基づくものであり, 事後的なバイアスの可能性を否定しえないほか, 問題点・要注意点として以下のようなものが挙げられる.

(1) 沈降線数が 3 本以上であっても偽陽性の可能性を否定できない症例が時に存在するため, CPA の診断は画像所見や臨床経過を含め総合的に評価する必要があること.

(2) 逆に, CPA であっても偽陰性を呈する例が (特に CNPA で) 散見され, かつ初回検査時には陰性で後日の再検査時に陽転化を認める症例も存在するため, 1 回の検査のみの陰性所見によって CPA を否定すべきでないと考えられる⁸⁾ こと.

(3) 本研究の CPA 症例は微生物学的確定例が少なく (今回, 喀痰や気管支洗浄液の培養にてアスペルギルス属菌を同定できた症例は CPA 19 例中 4 例であり, その同定結果は, *A. fumigatus* 1 例, *A. niger* 1 例, *Aspergillus spp.* 2 例であった), 微生物学的検討や, *non-fumigatus* のアスペルギルス属菌に対する本キットの有用性についての評価が十分でないこと.

(4) 本キットではまれに製品不良 (寒天への気泡混入やプレートからの寒天剥離など) が存在すること (本キットの輸入販売元であるコスモ・バイオ株式会社によると, 製品不良の報告頻度は全体の 1% 弱との回答であった).

これらの問題点について明確にするためにも今後の継続的な検討が必要と考えられた.

しかしながら CPA, 特に CNPA は抗真菌薬による薬物療法が必要な疾患であり, 近年, ポリコナゾール⁹⁾, ミカファンギン¹⁴⁾ などの有効性も示唆されている. 早期診断・早期治療が病勢コントロールのためにも望ましいと思われる以上, CPA の早期診断の一助となりうると思われる本検査のさらなる普及が期待される.

結 語

CPA の臨床診断における, *Aspergillus* immunodiffusion system キットを用いた血清アスペルギルス沈降抗体検査は, 陽性判定基準を沈降線数 2 本以上と設定すれば感度, 特異度, 陽性的中率, 陰性的中率のいずれも最良の結果を示すことが示唆され, その保険適応が望まれる. ただし偽陽性・偽陰性例の存在などには注意する必要があると考えられた.

本研究の要旨は真菌症フォーラム第 11 回学術集会 (平成 22 年 3 月, 東京) にて発表した.

謝辞: 本研究に際しご協力を賜りました, 国立病院機構福岡東医療センター臨床検査部 浜田寛子様, 伊藤健輔様に感謝いたします.

引用文献

- 1) Longbottom JL, Pepys J, Clive FT. Diagnostic precipitin test in *Aspergillus* pulmonary mycetoma. *Lancet* 1964; 1: 588-9.
- 2) Coleman RM, Kaufman L. Use of the immunodiffusion test in the serodiagnosis of aspergillosis. *Appl Microbiol* 1972; 23: 301-8.
- 3) Kurup VP, Fink JN. Evaluation of methods to detect antibodies against *Aspergillus fumigatus*. *Am J Clin Pathol* 1978; 69: 414-7.
- 4) Denning DW. Chronic forms of pulmonary aspergillosis. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7 (Suppl 2): 25-31.
- 5) 池本秀雄, 森 健, 山崎みどり. 肺アスペルギロームの患者血清における *Aspergillus fumigatus* 抗原に関する沈降素の研究: 抗原の種類, ならびに agar double diffusion と counterimmunoelectrophoresis との比較. 真菌と真菌症 1977; 18: 119-24.
- 6) 小川賢二, 奥村欣由, 二改俊章, 他. 慢性型肺アスペルギルス症の臨床的検討およびエラストラーゼ阻害物質の検討. 日医真菌会誌 2006; 47: 171-8.
- 7) 深在性真菌症のガイドライン作成委員会編. 深在性真菌症の診断・治療ガイドライン 2007. 東京: 協和企画. 2007.
- 8) Kitasato Y, Tao Y, Hoshino T, et al. Comparison of *Aspergillus* galactomannan antigen testing with a new cut-off index and *Aspergillus* precipitating antibody testing for the diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis. *Respirology* 2009; 14: 701-8.
- 9) Camuset J, Nunes H, Dombret MC, et al. Treatment of chronic pulmonary aspergillosis by voriconazole in nonimmunocompromised patients. *Chest* 2007; 131: 1435-41.
- 10) Kohno S, Masaoka T, Yamaguchi H, et al. A multicenter, open-label clinical study of micafungin (FK463) in the treatment of deep-seated mycosis in Japan. *Scand J Infect Dis* 2004; 36: 372-9.
- 11) 藤内 智, 山崎泰宏, 松本博之, 他. 既存肺疾患に続発した肺アスペルギルス感染症の検討. 日呼吸会誌 2004; 42: 865-70.
- 12) 前崎繁文. 肺炎 診断と治療の進歩: 肺真菌症. 日内会誌 2005; 94: 2301-6.
- 13) 二木芳人. 肺アスペルギルス症の診断基準・病型分類. 内科 2005; 95: 1011-5.
- 14) Izumikawa K, Ohtsu Y, Kawabata M, et al. Clinical efficacy of micafungin for chronic pulmonary aspergillosis. *Med Mycol* 2007; 45: 273-8.

Abstract

A retrospective clinical study about the serum *Aspergillus* precipitating antibody testing in our hospital

Yoichiro Ando ^a, Yasuhiko Kitasato ^{b,c}, Yoshiaki Tao ^b, Kazuko Matsunaga ^c, Shinji Ise ^b, Shohei Takata ^b, Midori Kubota ^a, Tomoaki Hoshino ^c, Masayuki Kawasaki ^b and Hisamichi Aizawa ^c

^a Department of Clinical Laboratory, National Hospital Organization Fukuoka-Higashi Medical Center

^b Department of Respiriology, National Hospital Organization Fukuoka-Higashi Medical Center

^c Division of Respiriology, Neurology, and Rheumatology, Department of Internal Medicine,
Kurume University School of Medicine

The objective of our retrospective clinical study was to investigate the validity of serum *Aspergillus* precipitating antibody testing (using the *Aspergillus* immunodiffusion system [Microgen Bioproducts Ltd., UK]) to diagnose chronic pulmonary aspergillosis (CPA). We gathered records of patients who required this test in our hospital from February to December in 2009. We examined the number of precipitation arcs, diagnoses of the patients, and frequencies of “false-negative” cases in “positive-result” patients and of “false-positive” cases in “negative-result” patients. In 24 positive-result patients, most showing more than two precipitation arcs in the test were patients with CPA, but it was doubtful that some were false-positive. In 99 negative-result patients, 85 were thought to be nonaspergillosis, but 4 with CPA showed false-negative results of this test at the first inspection. For the serodiagnosis of CPA, this test showed the best results if the positive judgment criteria were set as more than two precipitation arcs, such as sensitivity of 78.9% and a specificity of 95.6%. We consider this test useful for the clinical diagnosis of CPA.