

(1→3)- $\beta$ -D-glucan 測定により診断した深在性真菌感染症に対する miconazole の臨床効果

吉田 稔・坂本 忍・三浦 恭定  
自治医科大学血液科\*

大林 民典・河合 忠  
同 臨床病理

(平成2年7月16日受付・平成2年10月9日受理)

血液疾患に合併した深在性真菌感染症の血清診断法として真菌の菌体成分である(1→3)- $\beta$ -D-glucan の測定を用いた。方法は Endotoxin と (1→3)- $\beta$ -D-glucan 両者に反応するリムルステスト (toxicolor) と endotoxin のみに反応する測定系 (endospecy) の差として求めた。細菌学的に同定された真菌血症 10 例と剖検で確認された深在性真菌感染症 6 例の血漿中の (1→3)- $\beta$ -D-glucan 値はいずれも 10 pg/ml 以上であった。臨床的に深在性真菌感染症の合併を疑った血液悪性疾患患者 27 例にミコナゾールを投与した。全体での有効率は 63.0% (27 例中 17 例) で、特記すべき副作用は認められなかった。(1→3)- $\beta$ -D-glucan が高値群 ( $\geq 10$  pg/ml) では 81.3% (16 例中 13 例)、低値群 (<10 pg/ml) は 36.4% (11 例中 4 例) の有効率であった。(1→3)- $\beta$ -D-glucan 測定は深在性真菌感染症の早期診断として有望であり、それらに対する治療薬としてミコナゾールは有用である。

**Key words :** 深在性真菌感染症, (1→3)- $\beta$ -D-glucan, miconazole, immunocompromised host

近年、血液疾患をはじめとする immunocompromised host における深在性真菌感染症の増加が注目されている<sup>1)</sup>。本症は従来、生前の確定診断が困難であり、充分な治療がなされぬまま死亡することが多かった。血液疾患領域では顆粒球減少時の発熱に対し、通常は広域スペクトルの抗生素質を併用した経験的抗生物質療法 (empiric therapy) が行われる。治療開始 3~4 日後にその臨床効果を判定するが、無効の場合には深在性真菌感染症の疑いとして抗真菌剤の投与が推奨されている<sup>2)</sup>。しかしながら empiric therapy のみを継続した場合でも、顆粒球数の回復と共に薬剤の変更なしで解熱する症例がしばしば経験される。したがって empiric therapy に不応性であることを根拠に深在性真菌感染症の疑いとして報告されている症例が本当に真菌感染症を合併しているか否かは不明である。

深在性真菌感染症の生前診断法としては、生検材料による病理組織学的診断が最も確実であるが、immunocompromised host においては患者の全身状態などの理由から実際には充分な検索は行えず、通常は臨床材料の細菌学的検査に依存している。しかしながら咽頭培養や便からカ

ンダが分離されても、本来本菌が正常細菌叢の一員であるためその病因的意義付けは困難である。血液から真菌が分離されれば診断は確定するが、血液培養の陽性率が低い上にその中の真菌の頻度は約 1 割にすぎない<sup>3)</sup>。したがって血液培養の欠点を補う血清学的診断法の開発は臨床的に重要な課題である。一般に immunocompromised host においては抗体検出系は信頼性に乏しく、抗原検出系の方が有望と考えられる。従来 endotoxin (Et) の微量検出法として確立された limulus test<sup>4)</sup> はその反応機構の解明が進み、Et の他に真菌の菌体成分である (1→3)- $\beta$ -D-glucan ( $\beta$ -グルカン) にも反応することが発見された<sup>5)</sup>。近年合成基質を利用した limulus test (Toxicolor: 生化学工業)<sup>6)</sup> に加えて、この  $\beta$ -グルカンに反応する Factor G を除いた Et に特異的な測定系 (Endospecy)<sup>7)</sup> が開発された事により、両者の差を測定する間接的な方法ながら  $\beta$ -グルカン定量による深在性真菌感染症の診断への道が開かれた (Fig. 1)。

今回我々は深在性真菌感染症の早期診断法を確立する目的で、細菌学的および病理組織学的に本症が確認された症例における  $\beta$ -グルカン量を検討した。さらに臨床的に深在

真菌感染症の合併を疑った血液疾患患者にアゾール系抗真菌剤ミコナゾール(Miconazole(フロリードF注<sup>(R)</sup>))<sup>11</sup>を投与し、特に $\beta$ -グルカン量との関連についてその臨床効果を検討したので報告する。

### 1. 対象および方法

1) 細菌学的および病理組織学的に確認された深在性真菌感染症例における $\beta$ -グルカン量

対象は1985年12月より1988年12月までの間に自己医大血液科で経験した真菌血症10例と剖検により深在性真菌感染症が確認された6例で、 $\beta$ -グルカン量

は toxicolor と endospecy の測定値の差より求めた。真菌血症においては歿か検出された日の測定値を、剖検例においては死亡直前の測定値を解析に用いた。両法の測定の詳細は既報を参照されたい<sup>6,7)</sup>。Toxicolor, endospecy の正常値はそれぞれ 10 pg/ml および 3 pg/ml 以下である。

2) 臨床的に深在性真菌感染症を疑った症例に対するミコナゾールの臨床効果

基礎疾患に急性白血病や悪性リンパ腫などがあり感染症と考えられる発熱を呈した症例で、empiric ther-

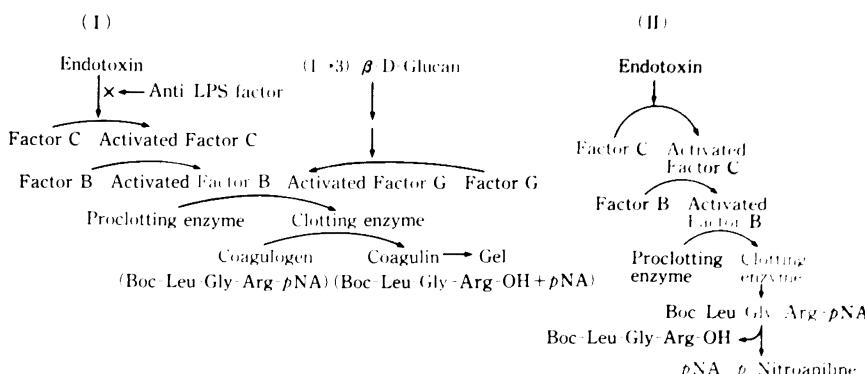
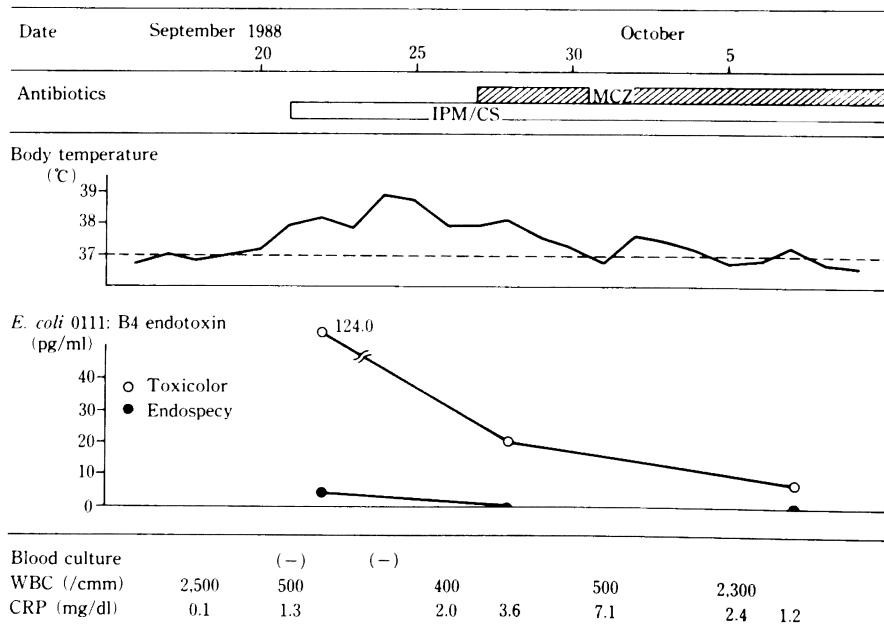


Fig. 1. The principles of Toxicolor (I) and Endospecy (II)



MCZ, miconazole; IPM/CS, imipenem/cilastatin sodium

Fig. 2. Case no. 3, 11 y.o. male, ALL

apyに不応性の27例にミコナゾールを投与した。ミコナゾールは1回200~400mgを生理食塩水または5%ブドウ糖液200mlに溶解し、1日2~3回、1時間で点滴静注した。原則として先行投与されている抗生物質は変更せず他の抗真菌剤の併用は行わなかった。深在性真菌感染症の有無の指標として上記の $\beta$ -グルカン量を参考とし、2群(10pg/ml以上ないし未満)に分けて臨床効果を検討した。効果判定は投与開始後1週間後および2週間後に患者の全身状態、発熱およびCRPなどの炎症反応を総合して判定したが、 $\beta$ -グルカン量の推移は効果判定には含めなかった。

## II. 結 果

Table 1に真菌血症および剖検により深在性真菌感染症の合併が確認された症例でのtoxicolorとendoscopyの測定値を示す。全例で両者の解離があり、今回は計算上の $\beta$ -グルカン値が10pg/ml以上を異常高値と判定し以下の症例解析の参考とした。

Table 2にミコナゾールを投与した症例の一覧を示す。症例6と15はグラム陽性菌の敗血症症例であるが、臨床的に深在性真菌感染症の合併を疑った症例である。また症例21は剖検にてアメーバ性肝臓瘍と診断された。全体での本剤の有効率は63.0% (27例中17例)であった。 $\beta$ -グルカン高値群では81.3% (16例中13

例)に対し $\beta$ -グルカン低値群では36.4% (11例中4例)の有効率であった( $p < 0.05$ )。次に典型的な症例を2例示す。

症例3: 11歳、男性、ALL (Fig. 2)

ALLの寛解導入療法後に発熱し、imipenem/cilastatin sodiumによりやや解熱傾向を示したが、改善は不充分で $\beta$ -グルカン値も高値であった。ミコナゾールを併用したところ炎症所見および臨床症状の改善をみ、 $\beta$ -グルカン値も正常となった。

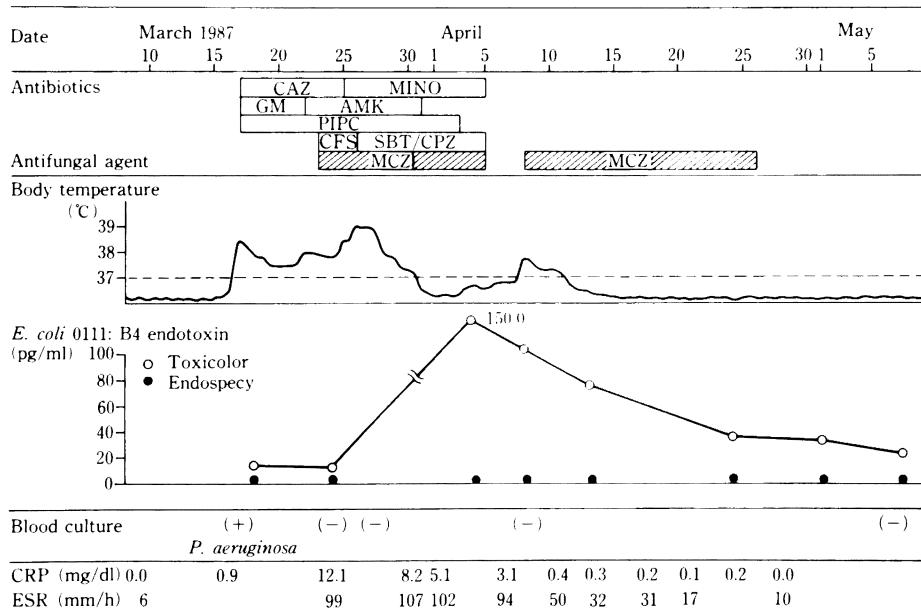
症例4: 52歳、男性、ALL (Fig.3)

ALLの寛解導入療法後*Pseudomonas aeruginosa*による敗血症を併発した。広域抗生物質の併用投与により解熱し抗生素を中止したが、その後 $\beta$ -グルカン値の急上昇と共に発熱した。ミコナゾールの単独投与により解熱し $\beta$ -グルカン値も減少した。

副作用: 一部の症例で食欲不振がみられた以外特記すべき副作用はみられなかった。

## III. 考 案

深在性真菌感染症の抗原検出系として現在最も信頼性の高いものはクリプトコッカスに対するラテックス凝集反応で、本法は診断のみならず抗原価の推移が病勢や治療効果の判定に役立っている。しかしながら臨床的に頻度の高いカンジダについてはその蛋白抗原を



CAZ, ceftazidime; MINO, minocycline; GM, gentamicin; AMK, amikacin; PIPC, piperacillin; CFS, cefsulodin; SBT/CPZ, sulbactam/cefoperazone; MCZ, miconazole

Fig. 3. Case no. 4, 52 y.o. male, ALL

Table 1. Summary of fungal sepsis and autopsy verified deep mycosis

Case no.	Age	Sex	Underlying disease	Concentration (pg/ml)			Clinical notes
				Toxicolor	Endoscopy	(1 → 3)- $\beta$ -D-glucan*	
<b>A. Fungal sepsis</b>							
1	48	M	CLL	15.3	0.6	14.7	<i>Candida albicans</i>
2	47	M	ALL	27.6	0	27.6	<i>Candida albicans</i>
3	37	M	ALL	23.9	0	23.9	<i>Candida tropicalis</i>
4	72	F	MM	402.0	0	402.0	<i>Candida guilliermondii</i>
5	61	M	CML BC	55.7	2.8	52.9	<i>Candida parapsilosis</i>
6	12	F	AA	394.4	4.3	390.1	<i>Candida glabrata</i>
7	61	M	AML	36.4	24.7	11.1	<i>Candida tropicalis</i> ** <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
8	32	M	AML	83.0	49.3	33.7	<i>Candida tropicalis</i> , <i>Candida krusei</i> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
9	59	M	AIHA	550.0	2.8	547.2	<i>Cryptococcus neoformans</i> ***
10	54	M	AA	37.5	13.1	24.4	<i>Trichosporon beigelli</i> **
<b>B. Autopsy-verified deep mycosis</b>							
11	45	F	AML	47.7	2.8	44.9	Systemic candidiasis
12	45	F	AML	207.9	1.7	206.2	Systemic candidiasis
13	62	F	AML	21.4	0	21.4	Systemic candidiasis
14	29	F	ALL	100.1	2.4	97.7	Systemic mucormycosis
15	69	M	AML	16.6	3.6	13.0	Fungal pneumonia ( <i>Candida albicans</i> , <i>Pseudomonas cepacia</i> )
16	65	F	AML	73.1	0	73.1	Systemic aspergillosis

CLL, chronic lymphocytic leukemia; ALL, acute lymphoblastic leukemia; MM, multiple myeloma; CML BC, chronic myelogenous leukemia blastic crisis; AA, aplastic anemia; AML, acute myelogenous leukemia; AIHA, autoimmune hemolytic anemia

\* Difference between Toxicolor and Endoscopy.

\*\* Deep mycosis was also verified at autopsy.

\*\*\* Meningitis was also documented.

測定するラテックス凝集反応 (CAND-TEC, Ramco社) や、代謝産物である D-アラビニートールを測定する方法などがあるが、まだ充分な信頼性を得ていない。  $\beta$ -グルカンはカンジダ、アスペルギルスをはじめ、多くの真菌に共通に含まれる物質であり<sup>6)</sup>、菌種の同定は不可能であるが、深在性真菌感染症のスクリーニングとしては有望な物質である<sup>9,10)</sup>。

今回の検討では細菌学的に、あるいは剖検で確認された深在性真菌感染症例での toxicolor と endoscopy の差は全例 10 pg/ml 以上であった。既報<sup>7)</sup>の様に tox-

icolor は Factor C を介して Et に反応する他に Factor G を介して  $\beta$ -グルカンに反応する (Fig. 1)。一方 endoscopy は Factor G が除かれており Et のみに反応する。両者の正常値は *E. coli* 0111: B 4 に換算すると 10 pg/ml と 3 pg/ml であり、理論的には両者の差が  $\beta$ -グルカン値と考えられ、その値は健常人では数 pg/ml 以下となる。事実現在生化学工業(株)で開発中の  $\beta$ -グルカンのみに反応する G テストを用いた健常人の値は (1 → 3)- $\beta$ -D-glucan に換算して 1 pg/ml 以下であった<sup>11)</sup>。今回は深在性真菌感染症例を retro-

Table 2. Clinical effect of miconazole in 27 patients with clinically suspected deep mycosis

Case no.	Age/Sex	Underlying disease	Antecedent antibiotics	Miconazole		Plasma $(1 \rightarrow 3)\beta$ -D-glucan/pg/ml*		Response	Clinical notes
				Dose (mg/day)	Duration (days)	Before	After		
<b>A. High plasma <math>(1 \rightarrow 3)\beta</math>-D-glucan group (<math>\geq 10</math> pg/ml)</b>									
1	34/M	AUL	CAZ, AMK, CLDM	1,200	29	31.7	6.0	Yes	
2	55/F	AML	PIPC, AMK, IPM/CS	600	21	27.3	n.d.	Yes	
3	11/M	ALL	IPM/CS	400	54	20.8	2.6	Yes	
4	52/M	ALL	(-)	600	18	148.9	21.0	Yes	
5	32/M	AML	PIPC, CMZ, GM	600	20	39.0	n.d.	Yes	
6	52/F	ALL	CAZ, PIPC, TOB	800	37	86.2	16.1	Yes	<i>S. mitis</i> sepsis
7	79/M	AML	CPZ, PIPC, AMK	600	15	11.1	n.d.	Yes	
8	34/F	AML	GM, CAZ, CFS, EM	400	28	22.8	2.9	Yes	Pneumonia
9	19/M	ALL	PIPC, TOB, CMZ	400	10	10.0	n.d.	Yes	
10	20/M	ALL	PIPC, CAZ, GM	400	17	121.4	1.6	Yes	
11	35/M	AUL	IPM/CS, AMK, MINO, CAZ	800	10	45.0	29.1	Yes**	Liver abscess
12	34/F	HD	FMOX, PIPC, GM	1,200	19	1	4	Yes***	
13	53/F	ALL	CMZ, PIPC, TOB	800	4	69.2	n.d.	Yes***	
14	56/F	AML	PIPC, CMZ	600	35	15.6	12.6	No***	
15	59/M	AML	ASPC, ISP, LMOX	800	21	22.8	17.6	No***	
16	37/M	ALL	IPM/CS, AMK, MINO	1,200	35	12.9	38.9	No***	
<b>B. Low plasma <math>(1 \rightarrow 3)\beta</math>-D-glucan group (<math>&lt; 10</math> pg/ml)</b>									
17	51/M	AML	CAZ, IPM/CS, GM	600	11	2.4	n.d.	Yes	
18	74/M	MDS	PIPC, AZT, AMK, VCM	600	6	2.9	2.9	Yes	
19	17/M	AML	PIPC, CZON	800	8	0	n.d.	Yes***	
20	11/M	ALL	PIPC, CAZ, GM	400	14	2.6	0	Yes***	
21	71/M	AML	ASPC, SBT/CPZ, AMK	1,200	21	2.4	1.2	No	Liver abscess
22	59/M	AML	MINO, CAZ, AMK	600	9	0	0	No***	
23	45/M	AML	CZX, AMK	800	42	0	2.2	No***	
24	54/F	NHL	CMZ, FOM, GM	600	15	3.7	n.d.	No***	
25	11/M	ALL	PIPC, CMZ, FOM	600	15	7.7	6.0	No***	
26	51/M	CML-BC	CAZ, AMK, DOXY	600	77	3.7	4.3	No***	
27	36/F	ALL	MINO, CAZ, ISP	800	8	5.8	4.3	No***	Lung aspergiloma

n.d. not done, AUL, acute undifferentiated leukemia; ALL, acute lymphoblastic leukemia; MDS, myelodysplastic syndrome; NHL, non Hodgkin's lymphoma; CML-BC, chronic myelogenous leukemia; CAZ, ceftazidime; AMK, amikacin; CLDM, clindamycin; PIPC, piperacillin; IPM/CS, imipenem/cilastatin sodium; CMZ, cefmetazole; GM, gentamicin; FMOX, flomoxef sodium; TOB, tobramycin; MINO, minocycline; CPZ, cefoperazone; CFS, cefsulodin; ISP, isepamicin; LMOX, latamoxef; CZON, ceftuzonam; AZT, aztreonam; VCM, vancomycin; SBT/CPZ, sulfactam cetoperazone; ASPC, aspoxicillin; DOXY, doxycycline; CZX, ceftizoxime; FOM, fosfomycin; St. *mitis*, *Streptococcus mitis*; MRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

\* Difference between Toxicolor and Endospecy.

\*\* Amphotericin B was used concurrently (10 mg daily for 10 days).

\*\*\* Antibiotics were changed during the infectious episodes.

spectiveに解析した結果から10 pg/ml以上を異常高値としたが、ミコナゾールに対する反応性もこの値を境に明らかな差が認められた。しかしこの $\beta$ -グルカン活性は toxicolor のロットにより相違があるため<sup>12)</sup>、異なるロット間での計算上の $\beta$ -グルカン値の比較は大きな意味を持たない。しかし同一ロットで経時的に測定した場合には今回示したようにCRP等と同様に、あるいはより疾患特異的な炎症反応のマーカーとなる。今後多数の症例の蓄積により治療終了時の指標としても役立つであろう。

Empiric therapy に不応性の症例中、 $\beta$ -グルカン高値群に対するミコナゾールの臨床効果は81.3%であった。これは道津ら<sup>13)</sup>のカンジダ血症の成績や浦部ら<sup>14)</sup>の抗生物質に反応しない血液疾患患者を対象とした成績と同様であった。特に今回の検討では大半の症例で先行投与された抗生物質は変更していないので、深在性真菌感染症に対する本剤の効果と判定できよう。しかしながら $\beta$ -グルカン低値群に対する有効率は36.4%と不良で、その理由としては本群の症例の大半は深在性真菌感染症を合併していなかった可能性が強い。この群の有効例については本検査が false negative であった可能性は否定できないが、同時に投与された抗生物質の効果を考えるべきであろう。

今回の検討で示したように、 $\beta$ -グルカンの測定は深在性真菌感染症の早期診断法として有望と考えられる。ミコナゾールの $\beta$ -グルカン高値群に対する優れた臨床効果もそれを裏付けるものと云えよう。本剤は従来の代表的な抗真菌剤である amphotericin-B に比し副作用が少なく、かつ同等の有効性が期待でき、血液疾患に伴う深在性真菌感染症の治療薬として有用と考えられる。

#### 謝 辞

本論文をまとめるにあたり貴重な御助言をいただいた自治医科大学臨床病理細菌検査室、林和主任および生化学工業(株)東京研究所、田中重則氏、田村弘志氏に深謝致します。

#### 文 献

- 1) 伊藤 章：内臓真菌症。真菌誌 26: 193~199, 1985
- 2) Pizzo P A, Robichaud K J, Gill F A, Witebsky F G: Empiric antibiotic and antifungal therapy for cancer patients with prolonged fever and granulocytopenia. Am J Med 72: 101~111, 1982
- 3) 吉田 稔、坂本 忍、三浦恭定：血液疾患に伴う敗血症の起炎菌に関する検討。臨床血液 28: 65~69, 1987
- 4) Levin J, Bang F B: Clottable protein in Limulus: Its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. Thromb Diath Haemorrh 19: 186~197, 1968
- 5) Morita T, Tanaka S, Nakamura T, Iwanaga S: A new (1→3)- $\beta$ -D-glucan-mediated coagulation pathway found in Limulus amebocytes. FEBS Lett 129: 318~321, 1981
- 6) Obayashi T: Addition of perchloric acid to blood samples for colorimetric limulus test using chromogenic substrate: Comparison with conventional procedures and clinical applications. J Lab Clin Med 104: 321~330, 1984
- 7) Obayashi T, Tamura H, Tanaka S, Ohki M, Takahashi S, Arai M, Masuda M, Kawai T: A new chromogenic endotoxin-specific assay using recombined limulus coagulation enzymes and its clinical applications. Clin Chim Acta 149: 55~65, 1985
- 8) 平谷民雄、山口英世：イミダゾール系抗真菌剤 miconazole (base) の *in vitro* 抗菌活性。Chemotherapy 32: 534~540, 1984
- 9) 吉田 稔、坂本 忍、三浦恭定、大林民典、河合忠、田村弘志、田中重則：カブトガニ凝固因子と合成基質を利用した Endotoxin の測定による重症血液疾患に伴う敗血症の診断率の向上。臨床血液 28: 818~822, 1987
- 10) 吉田 稔、坂本 忍、三浦恭定、大林民典、河合忠、田村弘志、田中重則：カブトガニ凝固因子の利用による重症血液疾患に伴うグラム陰性桿菌および真菌血症の診断率の向上。織田敏次監修、エンドトキシン臨床研究の新しい展開 25~31 頁、羊土社、東京, 1987
- 11) Obayashi T, Tamura H, Tanaka S, Ohki M, Takahashi S, Kawai T: Endotoxin-inactivating activity in normal and pathological human blood samples. Infect Immun 53: 294~297, 1986
- 12) Obayashi T, Tamura H, Tanaka S, Ohki M, Takahashi S, Arai M, Masuda M, Kawai T: Removal of limulus test-interfering factors in blood samples with perchloric acid and the improvement of the specificity of the limulus test by fractionating amebocyte lysate: in "Detection of bacterial endotoxins with the limulus amebocyte lysate test" ed. Watson S W, et al pp. 357~369, 1987
- 13) 道津安正、長井徹雄、須山洋之、福嶋弘道、藤田紀代、河野浩太、中西 啓、中富昌夫、原 耕平：カンジダ血症 11 例の臨床的、細菌学的検討および miconazole の治療効果。Chemotherapy 37: 1389~1396, 1989
- 14) 浦部晶夫、他(6 施設)：各種血液疾患に伴う真菌症および抗生素に反応しない発熱患者に対するミコナゾールの効果。Chemotherapy 36: 19~23, 1988

EFFICACY OF MICONAZOLE IN PATIENTS WITH SYSTEMIC FUNGAL INFECTION  
DIAGNOSED BY THE DETERMINATION OF PLASMA (1 → 3)- $\beta$ -D GLUCAN

Minoru Yoshida, Shinobu Sakamoto and Yasusada Miura

Division of Hematology, Department of Medicine, Jichi Medical School,  
3311-1 Yakushiji, Minamikawachi-machi, Kawachi-gun, Tochigi, Japan

Taminori Obayashi and Tadashi Kawai

Department of Clinical Pathology, Jichi Medical School

We evaluated the validity of determining plasma (1 → 3)- $\beta$ -D glucan in assisting the clinical diagnosis of systemic fungal infection by reviewing the data obtained from 10 patients with microbiologically documented fungemia and 6 patients with autopsy-verified deep mycosis. The concentration of (1 → 3)- $\beta$ -D-glucan was calculated from the difference between the results of Toxicolor (Seikagaku Kogyo, Ltd., Tokyo, Japan), which is sensitive to endotoxin and (1 → 3)- $\beta$ -D-glucan, and Endospecy (Seikagaku Kogyo, Ltd., Tokyo, Japan), which is sensitive only to endotoxin. The calculated plasma (1 → 3)- $\beta$ -D-glucan concentration was more than 10 pg/ml in all of the 16 patients. Miconazole, an antifungal agent, was administered to 27 febrile patients with clinically suspected systemic fungal infection. The overall response rate was 63.0% (17/27) and side effects were minimal. Of 16 patients with high plasma (1 → 3)- $\beta$ -D-glucan concentration ( $\geq 10$  pg/ml), 13 (81.3%) responded, although of 11 patients with low plasma (1 → 3)- $\beta$ -D-glucan concentration (< 10 pg/ml), only 4 (36.4%) responded. Miconazole is effective in treating systemic fungal infection and the determination of plasma (1 → 3)- $\beta$ -D-glucan concentration provides a good guide for its use.