

【原著・臨床】

真菌血症の新しい菌量迅速測定 PCR 法と菌種同定 nested PCR 法の開発

稲田 佳紀・角田 卓也・谷村 弘

和歌山県立医科大学第2外科学教室*

(平成12年10月10日受付・平成12年11月24日受理)

Candida 属に代表される真菌感染症は外科周術期における重要な課題の1つであるが、検体の直接培養や血清学的補助診断は所要時間や精度の点で十分ではなく、従来の真菌特異的 PCR 診断法も定性に過ぎず、抗真菌薬治療の要否を決定する cut off 値の設定と治療効果判定には定量化が必要である。また、抗真菌薬の感受性が菌種によって異なるため、薬剤の選択や投与量の決定に菌種の同定が求められる。本研究では、真菌血症における PCR を用いた定量分析法の確立を目標とし、*Candida albicans*-secreted aspartic proteinase 遺伝子を標的に蛍光プローブを設計して、real time quantitative PCR による *C. albicans* の菌量迅速測定法を開発した結果、*C. albicans* 含有血液から予測値にきわめて近似した PCR 定量値を得られた。手技は簡便であり、再現性にも優れていた。また、PCR による菌種同定法の確立を目標とし、外科臨床上重要な真菌5種 *C. albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* の 18 S-rRNA の V4 region を標的に迅速同定する nested PCR 法を開発した結果、真菌含有血液から5菌種の正確な同定が可能であることが立証できた。いずれも、臨床応用が可能であったことから、抗真菌薬治療の要否の決定から、治療効果と菌交代の有無の判定、抗真菌薬の増減量や変更の判断までを迅速にできる方法として期待される。

Key words: PCR 法, real time quantitative PCR, nested PCR, *Candida albicans*, *Candida* 属

医療技術の進歩によって手術適応が拡大され、患者の高齢化、中心静脈カテーテルの長期留置や広域スペクトラム抗菌薬の投与、骨髄障害を伴う抗癌薬の使用、拡大外科手術の施行などにより易感染性宿主 (compromised host) が増加し、それに伴って、*Candida* 属に代表される真菌感染症が外科周術期における重要な課題の1つとなっている^{1,2)}。特に全身性真菌症に発展すると予後はきわめて不良であるため、その重篤化を防ぐためには早期に的確な診断を行って治療を迅速に開始する必要がある^{3,4)}。

現在、わが国における真菌感染症の診断法には、検体の直接検鏡や培養検査のほか、カンジダ抗原や β -D-グルカンなどの血清学的補助診断はあるが、血液培養は迅速性に乏しいうえに陽性率が低く^{10,11)}、他の方法も精度の点で十分ではない^{12,13)}。

それゆえ、信頼性の高い迅速診断法が求められ、迅速性と特異性が高い診断法として polymerase chain reaction (PCR) が開発され^{14,15)}、分子生物学的手法による *Candida* 属の真菌血症の早期診断に臨床応用されはじめた¹⁶⁻¹⁷⁾。

しかし、われわれが開発して深在性真菌症の診断に臨床応用してきた方法も含め、従来の真菌特異的 PCR 法はあくまで定性に過ぎない。PCR では死菌からも DNA 増幅が可能であることなどから、PCR 陽性例でも臨床症状を認めない場合があり、陽性例のすべてに対して真菌血症の診断のもとに抗真菌薬投与の対象とすべきか否かが問題となる。したが

って真菌特異的 PCR の定量化が可能となれば、抗真菌薬治療の要否を決定する borderline/cut off 値の設定と治療効果の判定や、臨床病態のモニタリングが可能となるため、その臨床的意義は大きい。

さらに、臨床の場で繁用されるアゾール系抗真菌薬は *Candida glabrata* や *Candida krusei* に対して低感受性であるなど、*Candida* 属は菌種によって抗真菌薬の感受性が大きく異なり、抗真菌薬の選択や適正な投与量の決定のためには正確な菌種の同定が臨床に求められる。しかし、分離培養は時間がかかるうえ陽性率も低く、restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) 法などの分子生物学的診断法も真菌混合感染の場合には同定が困難となるなどの問題点があった¹⁸⁾。

本研究では、真菌血症における PCR を用いた定量分析法の確立を目標とし、定量的信頼性の高い real time quantitative PCR による *Candida albicans* の菌量迅速測定法を開発するとともに、PCR による菌種の迅速同定法の確立を目標とし、外科臨床上重要な真菌5種 *C. albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* を迅速同定する nested PCR 法を開発することを目的とした。

I. 対象と方法

1. PCR を用いた *C. albicans* の菌量測定法の開発 PCR 増幅された特異的 DNA 鎖を蛍光色素を用いて

経時的に分析する定量法である real time quantitative PCR 法^{38, 39)}を応用した。

両端を蛍光色素 (reporter 色素および quencher 色素) で標識した 30 bp の特異的プローブを、両プライマーに挟まれた領域に設計した。PCR 伸長過程で伸長鎖がプローブに到達すると、プローブは加水分解されて両色素間の距離は物理的に分離し、エネルギー順位の共鳴による抑制が解かれて蛍光強度が増加する原理にもとづく。蛍光強度をサイクルごとに検出し、PCR 増幅産物の増加に比例する reporter 色素の蛍光強度の増加が検出されはじめるサイクル数と既知の真菌量との関係から、未知量の真菌を定量するための検量線を作成した。

分析には PCR 装置、蛍光励起用ハロゲン光源、蛍光検出用 CCD カメラ、制御・解析用 PC から構成される GeneAmp[®]5700 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems 社、現 Applied Biosystems 社、USA) を用いた。

1) *C. albicans* 特異的プライマーと蛍光プローブの設計

プライマーには *C. albicans*-secreted aspartic proteinase (SAP) 遺伝子をターゲットとして、263 bp の DNA 断片を増幅するプライマー対 (forward primer: 5'-CTGCTGATATTACTGTTGGTTC-3' (bp 495 to 516 on SAP 6 from *C. albicans*), reverse primer: 5'-CCACCAATACCAACGGTATC-3' (bp 759 to 740 on SAP 6))⁴⁰⁾を用いた。

定量に直接関与する蛍光プローブは、両プライマーに挟まれた領域に特異的にハイブリダイズするように設計し (bp 535 to 564 on SAP 6), reporter 色素として 5' 側に "Fam" (6-carboxy-fluorescein), quencher 色素として 3' 側に "Tamra" (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) の両蛍光色素を付加した (5'-(Fam)-CGTTA-TTGTGACACTGGGTCTTCTGATTT-(Tamra)-3') を用いた。

2) PCR 反応液と測定条件の決定

PCR 反応液は全量 50 μ L (25 μ L: universal master mixture (Taq 酵素 (AmpliTaq Gold[®]), AmpErase uracil N-glucosylase (UNG), dNTP, dUTP, passive reference 1, optimized buffer), 4.5 μ L: 10 μ M each primer (900 nM), 1 μ L: 5 μ M Taqman probe (100 nM), 10 μ L: template) とした。

UNG incubation (carry over prevention) として 50 $^{\circ}$ C, 2 分間 hold の後、加熱により活性化される Taq 酵素の activation および UNG inactivation として 95 $^{\circ}$ C, 10 分間 hold の hot start で開始し、denature に 95 $^{\circ}$ C, 20 秒, annealing/extension に 58 $^{\circ}$ C, 1 分の 2 ステップで、反応サイクル数は 50 サイクルと設定した。

C. albicans は、TIMM 1768 株 (帝京大学医真菌研究センター提供) を酵母様真菌鑑別分離培地クロモアガ

ー・カンジダ[™]上に増殖させたコロニーを取り、液体培地で増殖させ、洗浄・cell count の後に 2 Na-EDTA 加ヒト正常血液 (全血) に添加混合して試料とした。

検量線の作成に用いる標準検体として、正確な cell count で調整した *C. albicans* 懸濁生理食塩液をヒト正常血液 (全血) 100 μ L に添加混合し、 1.0×10^9 cells/mL (1.0×10^6 cells/100 μ L/tube) の *C. albicans* 含有血液を作製した。この標準検体から核酸抽出剤 Sepa Gene[™] (三光純薬) を使用して抽出した DNA を TE (pH 8.0) に溶解し、さらに TE (pH 8.0) で順次 10 倍希釈して、 1.0×10^9 , 1.0×10^8 , 1.0×10^7 , 1.0×10^6 , 1.0×10^5 cells/mL に相当する DNA 量の希釈系列 5 種を作製し、検量線作成のための "標準" template とした。

定量性を評価するための検体として、 1.0×10^9 , 5.0×10^8 , 2.0×10^8 , 1.0×10^8 , 5.0×10^7 , 2.0×10^7 , 1.0×10^7 , 5.0×10^6 , 2.0×10^6 , 1.0×10^6 , 5.0×10^5 , 2.0×10^5 , 1.0×10^5 cells/mL の 13 種の *C. albicans* 含有血液を作製し、それぞれから DNA 抽出キットを用いて 13 種の DNA 量の "未知" template とした。

さらに、全血と生理食塩液のそれぞれに混合添加した場合の定量性を比較するため、真菌含有血液と真菌懸濁生理食塩液をそれぞれ 5.0×10^8 , 2.0×10^8 , 1.0×10^8 , 5.0×10^7 , 2.0×10^7 , 1.0×10^7 cells/mL の 6 種の濃度で作製し、DNA 抽出キットを用いて各 6 種、計 12 種の template とした。

2. nested PCR を用いた菌種同定法の開発

C. albicans, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* および *C. krusei* の PCR による菌種の同定法を確立するため、first PCR 終了後の全量 50 μ L より 1 μ L を template とし、菌種それぞれに特異的なプライマーを用いた nested PCR を行って菌種の同定を行った。

真菌 5 種の臨床分離株 (和歌山県立医科大学附属病院中央検査部微生物検査室提供) をそれぞれ 2 Na-EDTA 加血液 100 μ L に混合添加した真菌含有血液から DNA を抽出して、解析用試料とした。また、*C. albicans* と *C. tropicalis*, *C. albicans* と *C. parapsilosis*, *C. albicans* と *C. glabrata*, *C. albicans* と *C. krusei* の臨床分離株各 2 菌種をそれぞれ 2 Na-EDTA 加血液 100 μ L に混合添加した混合感染モデルを作製し、DNA を抽出して混合感染における菌種同定の可否を確認するための解析用試料とした。

First PCR, semi-nested PCR および nested PCR を行う PCR 装置として、GeneAmp[®] PCR system 9600 (Perkin Elmer 社、現 Applied Biosystems 社、USA) を用いた。

1) first PCR

真菌の 18 S-rRNA の遺伝子配列中で、*Candida* 属 5 種に特異的な V4 region をターゲットとするプライマー対^{22, 25, 28)} (forward primer: 5'-TATTAAAGTTGTTGC-

AG-3' (bp 532 to 548), reverse primer: 5'-CCTGCTTTGAACACTCTAATTT-3' (bp 672 to 651) を、nested PCR にさきだつ first PCR に使用した。

PCR 反応液は全量 50 μ L (5 μ L: 10 \times reaction buffer, 4 μ L: 2.5 mM dNTP (200 μ M), 1.25 μ L: 40 pmol each primer (50 pmol), 6 μ L: 25 mM MgCl₂ (3 mM), 0.25 μ L: Taq DNA polymerase (1.25 U), 10 μ L: template) で、denature に 94 $^{\circ}$ C, 1 分, annealing に 52 $^{\circ}$ C, 1 分 30 秒, polymerize に 74 $^{\circ}$ C, 1 分, 反応サイクル数を 40 回とした。

2. semi-nested PCR 法

真菌特異的 PCR 法 (first PCR) 施行後の PCR 産物を template とする semi-nested PCR を用いて、アゾール系抗真菌薬に抵抗性の *Candida* 属 2 種の菌種同定を検討した。

First PCR のプライマー対に挟まれた領域に、菌種特異的な一方のプライマー (semi-nested primer) を、*C. glabrata* は anti-sence 側に (*C. glabrata*-3': GCCAAGCCACAAGGACTTGG), *C. krusei* は sence 側 (*C. krusei*-5': CTACCTATGGTAAGCACTGTT) に設計した。片方のプライマーは first PCR のプライマーと同一とした。反応液は、first PCR 産物 1 μ L を鋳型として全量 50 μ L (5 μ L: 10 \times reaction buffer, 4 μ L: 2.5 mM dNTP (200 μ M), 1.25 μ L: 40 pmol each primer (50 pmol), 6 μ L: 25 mM MgCl₂ (3 mM), 0.25 μ L: Taq DNA polymerase (1.25 U), 1 μ L: template) とし、denature に 94 $^{\circ}$ C, 1 分, annealing に 52 $^{\circ}$ C, 1 分 30 秒, polymerize に 74 $^{\circ}$ C, 1 分, 反応サイクル数を 20 回とした。

3. nested PCR 法

C. albicans, *C. tropicalis* および *C. parapsilosis* の 3 菌種については、target 領域内での sequence が近似しているために semi-nested primer の設計が難しく、5 菌種の同定には (full-) nested PCR 法がより適切であると考え、first PCR のプライマー対に挟まれた領域に、それぞれの菌種に特異的なプライマー対 (nested primer) を新たに設計した。*C. glabrata* と *C. krusei* についても、PCR 至適条件の適正化のため、新規にプライマーを設計した ([*C. albicans*] 5'-GGCCGGTCCATCTTTTTG-3' and 5'-AGTCCTGGTTCGCCA-TAAATG-3', [*C. tropicalis*] 5'-GGCCGGTCCATCTTTCTGAT-3' and 5'-AAAGTCCTGGTTCGCCAA-AA-3', [*C. parapsilosis*] 5'-GCCGGTCCATCTTTTTGAT-3' and 5'-AAAGTCCTGGTTCGCCAAA-3', [*C. glabrata*] 5'-TTCGTGTACTGGAATGCACCC-3' and 5'-AAAGT-AAAAGTCCTGGTTCGCC-3', [*C. krusei*] 5'-GCGGACGGTCTACCTATGGTAA-3' and 5'-AGTAATCGTCCTGGTTCGC-3')。

反応液は、first PCR 産物 1 μ L を鋳型として全量 50

μ L (5 μ L: 10 \times reaction buffer, 4 μ L: 2.5 mM dNTP (200 μ M), 1.25 μ L: 40 pmol each primer (50 pmol), 1 μ L: 25 mM MgCl₂ (0.5 mM), 0.25 μ L: Taq DNA polymerase (1.25 U), 1 μ L: template) とし、denature に 94 $^{\circ}$ C, 1 分, annealing に 54 $^{\circ}$ C, 1 分 30 秒, polymerize に 74 $^{\circ}$ C, 1 分, 反応サイクル数を 20 回とした。

II. 結 果

1. PCR を用いた *C. albicans* の菌量測定

エチジウムブロマイド電気泳動による予備実験では、*C. albicans* 含有血液と *C. albicans* 懸濁生理食塩液から目的とする真菌由来の PCR 産物が得られ、非特異的産物はないことが確認できた。また、健康人全血と no template control からはいずれの PCR 産物も確認されなかった (Fig. 1)。

C. albicans 含有血液の PCR を行い、reporter 色素の蛍光強度をサイクルごとに検出すると、真菌由来の PCR 増幅産物の増加による蛍光強度の指数関数的な増加が観察された。標準サンプルとして *C. albicans* 含有血液からの DNA 抽出液の希釈系列を template とすると、濃度ごとに異なるサイクル数で立ち上がる蛍光強度の増幅曲線が得られた。

蛍光強度の増加が検出されはじめるサイクル数 (threshold cycle) と *C. albicans* 希釈系列の既知量の関係から検量線を作成すると、10³~10⁹cells/mL の血中 *Candida* の検出には定量性の存在を示す直線性が得られた (Fig. 2)。

検出された未知サンプルの蛍光強度を、標準サンプルから作成した検量線に対応させた定量分析の結果、1.0 \times 10³cells/mL から 1.0 \times 10⁹cells/mL まで、濃度比 10,000 倍におよぶ範囲で、予測値と PCR 定量による実測値の %difference は -9.2 \pm 11.6% に留まった (Table 1)。この予測値と実測値を両対数グラフにプロットして比較し、10⁵cells/mL 以上の菌量なら、10⁶cells/mL まで予測値にきわめて近似 (logY=0.983 logX+0.070, r=0.998, P<0.001) した PCR 定量値が得られることが確認できた (Fig. 3)。感度は少なくとも 5.0 \times 10³cells/mL から確保できることがわかった。分析に要した時間は、DNA 抽出に 1.5 時間、PCR 増幅および測定に 2.5 時間の合計 4 時間であった。

C. albicans を全血中に混合添加した場合と、生理食塩液中に混合添加した場合を比較するため、両者の同濃度の混合液を PCR 定量した結果、真菌含有血液では良好な定量結果が得られたのに対して、真菌懸濁生理食塩液では低濃度になるにしたがって予想値との乖離が大きくなり、5.0 \times 10⁶cells/mL 以下では測定限界以下となり検出できなかった (Fig. 4)。

臨床検体に対する応用: 70 歳、男性 胃癌・肝浸潤術後。腹腔内真菌感染を疑い、腹腔ドレーン排液の真菌 PCR 診断が陽性であったため、real time PCR 法を用

いて排液中の菌量測定を行った。PCR 定量結果は 4.13×10^4 cells/mL であり、腹腔内 *C. albicans* 感染であると診断し、抗真菌薬による治療を開始した。同日の採取ではないが、一般細菌 2 種とともに培養検査でも真菌が検出された (Fig. 5)。

2. nested PCR を用いた菌種同定法

1) semi-nested PCR 法

C. glabrata と *C. krusei* について菌種特異的な PCR 産物が得られることが agarose gel 電気泳動において確認され、当該真菌由来以外の PCR 産物は gel 上に認めず、この真菌 2 種の同定が可能であることが判明した。

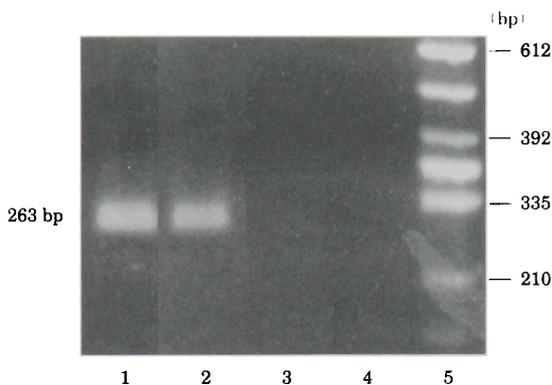


Fig. 1. PCR detection of *Candida albicans*-SAP gene in thermal cycling condition for real-time PCR.

Lanes; 1, human whole blood + *C. albicans*; 2, saline + *C. albicans*; 3 and 4 are negative controls. Lane 3, human whole blood; 4, saline; 5, molecular size marker- ϕ X-174 RF DNA-Hinc II digest. These primers were confirmed specific for *C. albicans* under the condition for this reaction, and had no-cross reaction with DNA from human blood.

2) nested PCR 法

5 菌種を target にした nested PCR により、それぞれ菌種特異的な PCR 産物が agarose gel 電気泳動にて確認され、当該真菌由来以外の PCR 産物は gel 上に認めず、真菌 5 種の同定が可能であることが判明した (Fig. 6)。混合感染モデルにおいても、正しく同定可能であった (Fig. 7)。

臨床検体に対する応用:

症例 1: 70 歳, 男性。腸閉塞術後、誤嚥性肺炎併発。抗真菌薬で解熱しない不明熱に対して、真菌感染を疑った。血液からの真菌 PCR は陽性であり、nested PCR 法で即日 *C. glabrata* であると診断した。後日、血液

Table 1. Quantitative results of "unkown" samples

	Actual amount (cells/mL)	Measured amount ^a (cells/mL)	%difference ^b (cells/mL)
①	1.0×10^9	1.02×10^9	+2.0
2	5.0×10^8	3.53×10^8	-29.4
③	2.0×10^8	2.05×10^8	+2.5
④	1.0×10^8	8.22×10^7	-17.8
5	5.0×10^7	4.29×10^7	-14.2
⑥	2.0×10^7	1.36×10^7	-32.0
⑦	1.0×10^7	6.92×10^6	-30.9
8	5.0×10^6	4.19×10^6	-16.2
9	2.0×10^6	2.45×10^6	+22.2
⑩	1.0×10^6	8.87×10^5	-12.6
1①	5.0×10^5	6.52×10^5	+30.4
12	2.0×10^5	1.77×10^5	-11.4
⑬	1.0×10^5	8.84×10^4	-11.6
14	0	0	-
			-9.2 ± 11.6

^a Average of 2~4 times measurement

^b Measured amount/actual amount - 1

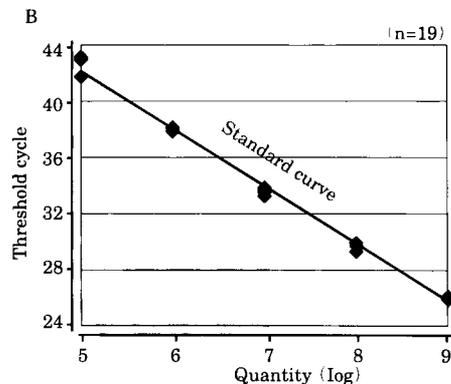
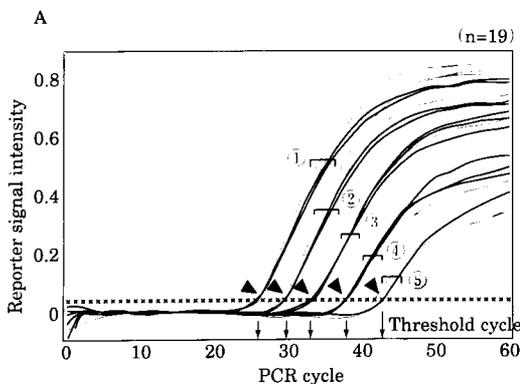


Fig. 2. Quantitative analysis of standard samples.

(A) Amplification plot of *Candida albicans*-SAP gene on standard samples. The standard sample-diluted DNA solution-corresponded to *C. albicans* ① 1.0×10^9 , ② 1.0×10^8 , ③ 1.0×10^7 , ④ 1.0×10^6 , ⑤ 1.0×10^5 cells per human blood 1 mL. The reporter signal intensity rapidly increased at a particular threshold cycle corresponding to each amount and plateaued later. (B) Standard curve of *C. albicans* DNA. The initial *Candida* amount was closely correlated with the threshold cycle ($Y = -4.14 \log X + 62.91$, $r = 0.997$, $p < 0.001$).

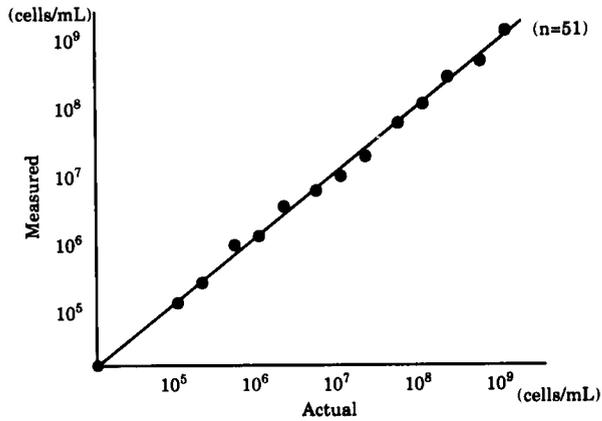


Fig. 3. Quantitative results for "unkown" samples. (1) Measured numbers were closely correlated with actual numbers of *Candida* in blood. ($\log Y = 0.983 \log X + 0.070$, $r = 0.998$).

培養検査で *C. glabrata* の検出が報告され, nested PCR 法の結果と一致した (Fig. 8)。

症例 2: 52 歳, 女性。腸閉塞術後。腹腔ドレーン排液の性状などから腹腔内真菌感染を疑った。腹腔ドレーン排液の真菌 PCR は陽性であり, nested PCR 法で即日 *C. glabrata* であると診断した。培養検査の結果からも, 他の一般細菌 2 種と共に *C. glabrata* が検出が後日報告され, nested PCR 法の結果と一致した (Fig. 9)。

このほか, 複数の臨床検体で菌種同定に成功し, 培養検査と比べても有用性が確認できた (Table 2)。

III. 考 察

中心静脈カテーテルの長期留置や広域スペクトラム抗菌薬の投与などによる易感染性宿主の増加は, 今日の外科学者の真菌感染症の増加をもたらし, 特に消化器外科領域においては, 術後感染症からの検出菌の 25% を真菌が占めるといわれる¹⁴⁾。常在菌である腸管内の真菌は, 抗菌薬の投与による腸内細菌叢の攪乱や腸管の虚血

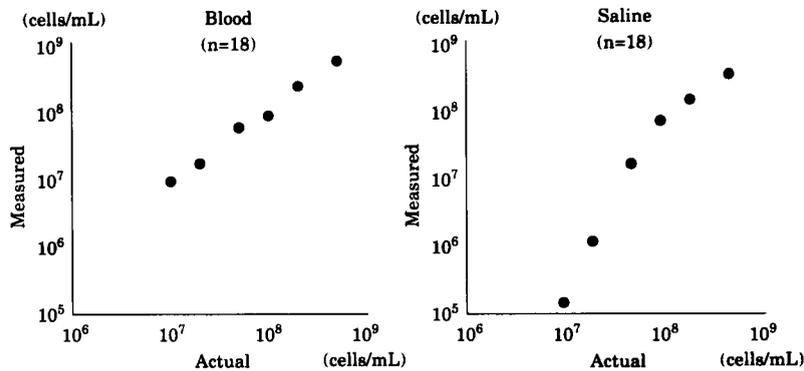


Fig. 4. Quantitative results for "unkown" samples. (2) In saline, unlike in whole blood, measured numbers did not correlate with actual numbers of *Candida albicans*, especially in low concentrations.

Case: 70 yo/M, Gastric ca. with liver invasion (post op.)

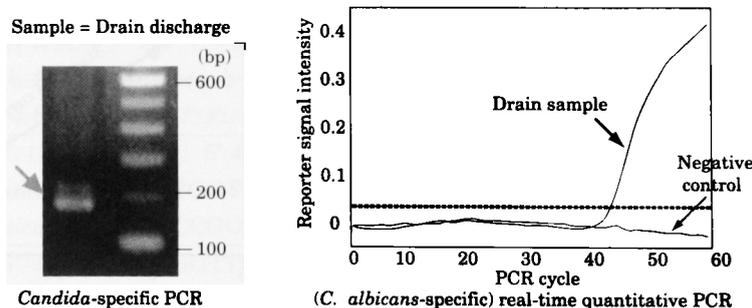


Fig. 5. Quantitative determination in clinical samples.

Quantitative determination of *Candida albicans* by real-time quantitative PCR was applied to a postoperative intraperitoneal abscess. Drain discharge was found to be positive in *Candida*-specific PCR, and 4.13×10^6 cells per drain discharge 1 mL were measured by real-time quantitative PCR. Along with bacteria (*Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecium*), *C. albicans* and *Candida glabrata* were detected from germ culture.

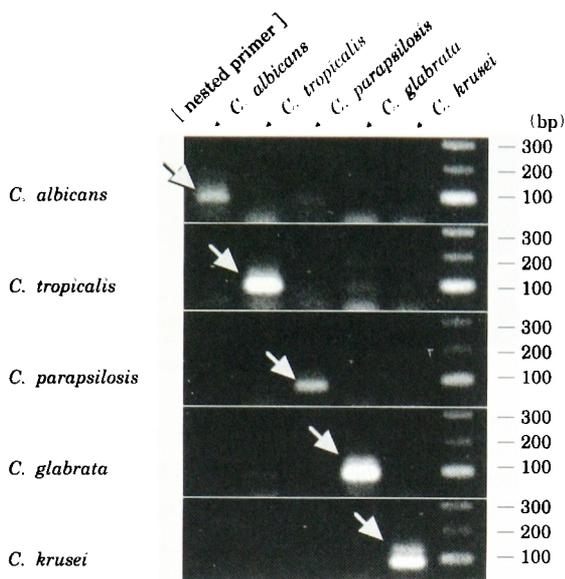


Fig. 6. Identification of *Candida* sp. by nested PCR (1). Nested PCR was developed to identify medically important *Candida* species. The specific nested primer pair for the V4 region of the 18S ribosomal RNA gene of *Candida* species was applied. Species-specific reaction products were obtained, and *Candida* species were identified correctly.

などによって腸管粘膜上で増殖し、門脈経路を介して血中移行 (fungal translocation) し、さらに中心静脈カテーテルに寄生して増殖し、血中散布される可能性がある^{41,42)}。実際、術中から術後早期にかけて β -D-グルカン値が一過性に上昇するとともに、真菌 PCR 法が末梢血中と門脈血中で陽性化した症例を複数経験した。

深在性真菌症から全身性真菌症に発展すると、予後はきわめて不良である。基礎疾患の重症度にもよるが、検出菌がグラム陽性菌やグラム陰性菌の場合と比べて、真菌血症の死亡率は有意に高い⁴³⁻⁴⁵⁾。また、真菌性眼内炎については、その多くが消化器・胆道系疾患を基礎疾患とする症例であり、中心静脈カテーテルの留置例に有意に多い^{46,47)}。

真菌感染の重症化を防ぎ、眼内炎の発症を抑止するためには、早期に診断を行って、治療を迅速に開始する必要があるが、ヒトの常在菌でもある *Candida* 属が起炎菌であることを立証するには、本来無菌である血液などの検体からの *Candida* の証明が必要である。血液培養で真菌が検出されれば確定診断となるが、迅速性に乏しく、陽性率も 10% 以下と低い^{10,11)}。

血清学的補助診断も、わが国で繁用されているカンジダ抗原 (CAND-TEC[®]; Ramco 社) は検出される抗原の本体が不明確であるうえ、精度、特異度が低く、信頼性に劣る。また、リムルテストを応用した真菌壁成分の検出法として用いられる (1→3)- β -D-グルカンの有用性を示す報告は少なくないが、生体内における病態

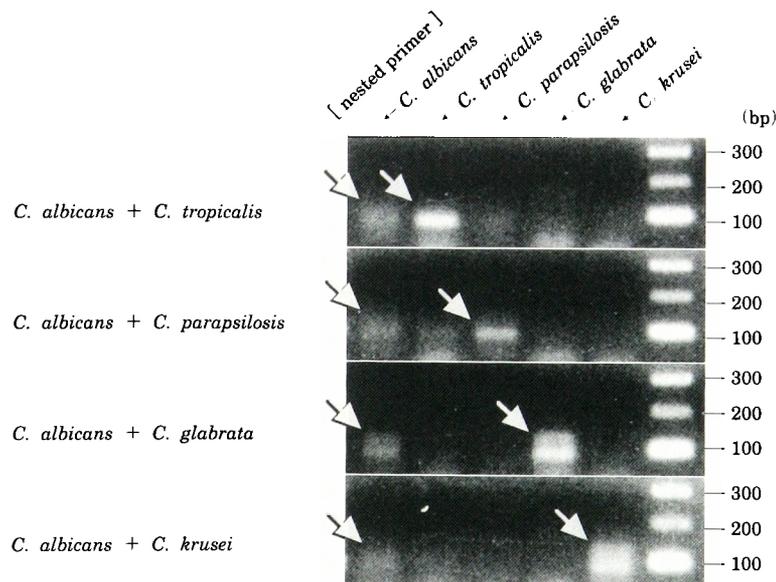


Fig. 7. Identification of *Candida* sp. by nested PCR (2). *Candida* species were identified correctly in mixed infection models. These results indicated that nested PCR was reliable to identify in mixed infection cases.

Case 1: 70 yo/M, ileus (post op.), aspiration pneumonia
Sample = Blood

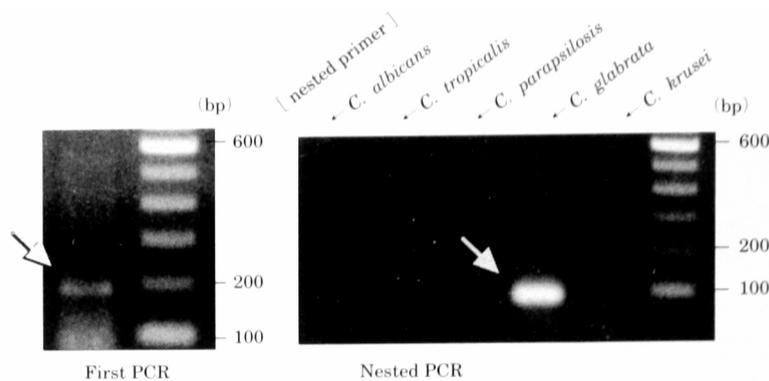


Fig. 8. Identification of *Candida* sp. by nested PCR in clinical sample (1). Nested PCR was applied to candidemia. Blood was found to be positive in *Candida*-specific PCR, and was identified as *Candida glabrata* by nested PCR. *C. glabrata* was detected from blood culture, and the two coincided.

Case 2: 52yo/F, ileus (post op.)
Sample = Drain discharge

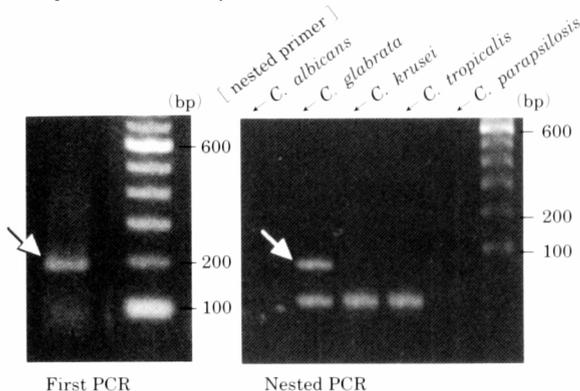


Fig. 9. Identification of *Candida* sp. by nested PCR in clinical sample (2).

Nested PCR was applied to a postoperative pelvic abscess. Drain discharge was found to be positive in *Candida*-specific PCR, and was identified as *Candida glabrata* by nested PCR. Along with bacteria (*Alcaligenes xylosoxidans*, *Staphylococcus aureus* (MRSA)), *C. glabrata* was detected from germ culture, and the two coincided.

代謝が十分解明されていないうえ¹²⁾, cut off 値の設定にも検討の余地があり, 肝機能低下や血液透析の施行例, 抗癌薬投与例などの病態の影響や, 血液製剤などの影響, 偽陽性物質の存在も示唆される¹³⁾. 和歌山県立医科大学第2外科で1997年2月~1998年3月に行った検討でも, *Candida* 特異的 PCR 法で陰性の105例のうち, 肝硬変・肝炎や腎不全を有するか, あるいは抗癌薬投与中の症例は, β -D-グルカン正常域 (<20 pg/mL)

の症例では14%(8例/57例)に過ぎなかったのに対し, β -D-グルカン高値 (≥ 20 pg/mL) と判定された症例では41.7%(20例/48例)と有意に多かった。外科患者の周術期は肝臓や腎臓の病態変化が起こり, β -D-グルカンは臨床的信頼性に劣るといえる

したがって, 抗菌薬無効の不明熱に対して真菌感染を疑う場合, 熱型などの全身状態や血清学的補助診断などから総合的に診断するしか方法がなかった。また, 抗真菌薬の変更時期や治療の中止時期についても指標とすべき明確な診断法がなかったため, 経験的治療に陥る傾向があった。

1990年, Buchman らによって真菌の検出に導入された分子生物学的手法は¹⁴⁾, 1995年, Deventer らによる真菌の18S-rRNAの遺伝子配列のなかで *Candida* 属に特異的なV4 regionをターゲットとするPCR法の報告に至って³¹⁾, 積極的に臨床応用が可能となった¹⁴⁻³²⁾。われわれの共同研究者の紺谷はV4 regionをターゲットとするPCR法を真菌血症の早期診断に発展・応用させ, 血清学的診断法に対するPCR法の臨床的信頼性での優位を証明し³⁴⁻³⁶⁾, 外科領域の深在性真菌症の診断と治療にPCR-oriented antifungal therapy (POAT)を提唱するに至った。

しかし, 真菌PCR法は迅速性と特異性が高いものの定性に過ぎない。PCRでは死菌からもDNA増幅が可能であることなどから, PCR陽性例でも臨床症状を認めない場合があり, 一過性の陽性化も考えられる。高感度であるがゆえに, over diagnosisにはならなくとも, PCR陽性例のすべてに対して真菌血症の診断のもとに抗真菌薬投与の対象とすべきか否かが問題となる。

そこで紺谷らは, 一般に再現性が比較的よいとされる

Table 2. Nested PCR versus culture for the identification of *Candida* sp. in clinical sample

Case	Sample	nested PCR	Culture
Age/Gender/Primary disease			
70 M Ileus (post op.) pneumonia	blood	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
52 F Ileus (post op.)	drain	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i> (+ + +) <i>S. aureus</i> (MRSA) (+ + +) <i>Alcaligenes xylosoxidans</i> (+ + +)
52 F Ileus (post op.)	blood	<i>C. glabrata</i>	(-)
37 M Gastric ca. (post op.)	blood	<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>
61 M Gastric ca. (post op.) Liver metastases	blood	<i>C. albicans</i>	(-)

*ca. = cancer, *op. = operative stage

competitive PCR 法³¹⁾を応用した *Candida* 属の定量法を開発したが³¹⁾、解析可能な定量範囲が濃度比 100 倍程度と比較的狭く、煩雑な手技に起因する contamination の問題もあり、臨床検体での定量には成功しなかった。また、エンドポイント解析による定量的 PCR 法も、酵素の失活などのために増幅効率が刻々と変化して最終的にプラトーに達する PCR の性質から、初期鋳型 DNA 量を正確に反映せず、半定量に過ぎない。

これに対して、real time quantitative PCR 法は定量的信頼性が高く、簡便で、密閉容器中で検出が進むため contamination の可能性も低い。本研究では、この real time PCR 法を用いて、臨床検体からもっとも高頻度に検出される *C. albicans* の菌量迅速測定法を開発し、 10^5 cells/mL 以上の菌量なら予測値に近似した PCR 定量値を得られることを確認した。また、感度が少なくとも 5.0×10^3 cells/mL から確保できたことから、臨床例でのドレーン排液中の真菌の定量には成功した。したがって、ドレーン排液中の菌量の増減を後日再検することで、病態の把握が可能となる。

血液中の真菌量と臨床症状との関連が注目されるが、臨床検体での血液中の真菌量の測定には、さらに検出感度を上げる必要がある。そのうえで、PCR 陽性となった臨床例について、PCR 定量の結果と直接培養、 β -D-glucan 値、臨床症状 (発熱・SIRS・全身状態・眼底所見)、臨床検査値 (CRP、白血球分画)、抗真菌薬による臨床的反応などとの関連を含め、経時的に採取した臨床検体での定量分析結果の蓄積が、治療を要する真菌 DNA 量 (cut off 値) を決定するために必要である。

真菌血症では真菌菌体の大部分が白血球に捕食された状態で循環血中を流れ、通常の遠心分離では菌体の 99% が白血球層に集まり、血漿中の菌体は 1% に過ぎない³²⁾。定量性への影響を考慮して、検体には血漿成分と赤血球を除いた白血球画分ではなく、EDTA で抗凝固処理をした全血を用いた。遠心分離処理が不要であることは、測定時間の短縮にも有利である。捕食された菌体

と死菌を除外する意味で血漿中からの真菌の検出が感染性を考慮するうえでむしろ適当であるか否かは、今後の検討課題である。

Real time PCR 法は、既知 DNA 量と未知 DNA 量は PCR と蛍光強度を介して、いわば相対比で表現されるため、基準となる標準検体の設定にかかわる効率的な DNA 抽出は必須である。酵素処理による DNA 抽出法では 5 時間以上もかかるため、非フェノール性試薬と蛋白質凝集剤を使用し、比重の違いを利用して凝集分配する DNA 抽出キットを用いたが、わずか 1 時間と迅速性が高い一方で、同一サンプルから一部で 30% 程度の定量値の変動を生じた。同一の template を分割して個々に定量した結果と比較すると、定量値の変動の責は、明らかに抽出段階での DNA 回収率によるところが大きかった。一方、*C. albicans* を全血中と生理食塩液中にそれぞれ混合添加した場合を比較する目的で、両者の同濃度の真菌混合液をサンプルとして定量した結果、真菌含有血液では良好な定量結果が得られたのに対して、真菌懸濁生理食塩液では低濃度になるにしたがって予想値との乖離が大きくなった。前者では DNA 抽出の際にヒト DNA が真菌 DNA と共沈して、核酸ペレットの浮遊・流出を阻止できたが、後者では DNA 抽出の際に核酸ペレットの一部が浮遊して流出したため、低濃度になるほど DNA の回収率が悪くなったと考えた。通常真菌 PCR 法には迅速で簡便な DNA 抽出法が望ましいが、菌量測定 PCR 法では、DNA 抽出の信頼性が定量の信頼性に直結するため、迅速性よりも抽出効率の安定が要求され、検討課題である。

Candida 属は、莢膜など構造上の特徴などから、菌種によって抗真菌薬に対する感受性が大きく異なる。比較的副作用が低く、臨床の場で頻用されるアゾール系抗真菌薬 fluconazole (FLCZ) は *C. glabrata* や *C. krusei* に対して低感受性であり、FLCZ の予防投与により *C. krusei* の検出率が増加したとの報告もある⁴⁹⁾。*C. albicans* などについても、耐性菌の出現や itraconazole

との交差耐性の問題がある^{26,27}。一方、真菌性眼内炎対策や薬剤耐性の観点からは、病原菌種に感受性の高い抗真菌薬を早期から十分量投与することが望ましい。迅速かつ正確な菌種判定が血液培養以外の方法で可能となれば、無計画な抗真菌薬投与による耐性菌出現の抑止でき、効果的な治療計画をたてることができる。

本研究で first PCR として選択した V4 region を target とする PCR 法では、*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* から、agarose gel 電気泳動において、それぞれ 163 bp, 162 bp, 164 bp, 177 bp, 159 bp の大きさの菌種特異的なバンドが得られるが、gel 上での判別は事実上不可能である。

PCR 産物から起因菌種を同定する方法としては、直接塩基配列を測定する方法、Southern blot 法、single-strand conformation polymorphism (SSCP) 法²⁸がある。紺谷らは *Candida* 5 種の V4 region の遺伝子配列の検討から、増幅 DNA の特異的な部位を認識する制限酵素で処理する RFLPs 法^{29,30}による菌種同定法を開発したが³¹、手技が煩雑なうえ、真菌混合感染例では同定がきわめて困難であるため、臨床応用には至らなかった。また最近では、菌種の同定に菌種特異的プローブを用いる方法が開発され^{32,33}、真菌の検出から同定までを 1 回の PCR で行うことも可能となった。蛍光標識プローブを用いた方法では、混合感染モデルや臨床検体での診断も可能であるとされ³⁴、注目される。

本研究では、アゾール系抗真菌薬に感受性が低い真菌 2 種を同定する semi-nested PCR 法を開発した結果、first PCR 施行後の PCR 産物を template として、真菌 2 種に特異的な PCR 産物が得られることが確認でき、菌種の同定が可能であることが判明した。この方法は、*Candida* 5 種をアゾール耐性の高低でグループ分けできるため、抗真菌薬の選択に有用であり、臨床的な利用価値はある。しかし、FLCZ 耐性 *C. albicans* 株の存在や、今後開発される抗真菌薬の選択まで考えた場合、5 種を正確に同定できる方がより臨床的有用性が高い。

そこで、より特異性の高い菌種同定法の確立を目標に再設定して、nested PCR 法を開発した結果、真菌 5 種に特異的な PCR 産物が得られることが確認でき、さらに混合感染でも同定可能であった。臨床試料でも、菌種同定が可能であった。真菌特異的 PCR 法で陽性と判定された検体は、そのわずか 3 時間後には菌種まで同定することが可能となった。

菌種同定 nested PCR 法は、すでに真菌感染を疑う多数例の臨床診断に応用して、臨床的有用性を証明した V4 region をターゲットとする *Candida* 特異的 PCR 法をそのまま利用できる点で優れている。さらに、検査対象を first PCR で陽性であった検体のみ限定するため、低コストでもある。本法による菌種同定・診断は、

抗真菌薬に対する MIC まで勘案した効率的な治療を即日開始することを可能とし、菌交代の有無の診断から抗真菌薬の変更の要否の判定を可能とするなど、今後の臨床応用が期待され、現在、臨床検体を用いて臨床的有用性の評価を開始している。

抗真菌薬治療の要否の決定から、治療効果と菌交代の有無の判定、抗真菌薬の増減量や変更の判断までを迅速にできる方法を確立できたことにより、今後は、精度の向上と検査に要する費用の軽減化、時間の短縮に改善を加え、臨床普及をめざしたい。

謝 辞

本研究の一部は、平成 8~10 年度文部省科学研究費補助金基礎研究 (B) 課題番号 08457331 による。

本研究の要旨は、第 35 回日本外科代謝栄養学会総会 (1998 年)、第 1 回日中深在性真菌症会議 (北京、1999 年)、第 1 回真菌症フォーラム学術集会 (2000 年、奨励賞受賞)、第 100 回日本外科学会総会 (2000 年)、第 48 回日本化学療法学会総会 (2000 年、編集委員会より推薦) にて発表した。

文 献

- 1) 谷村 弘, 角田卓也, 石本喜和男, 他: 外科周術期重症感染症の現状と対策—原因菌不明の外科感染症。日本外科学会雑誌 97: 1066~1071, 1996
- 2) 廣川文鏡, 谷村 弘, 石本喜和男, 他: 消化器癌手術 1483 例における術後検出菌の特徴。和歌山医学 47: 372, 1996
- 3) 角田卓也, 谷村 弘, 馬庭芳朗: 重症感染症: 消化器外科における深在性真菌症。Medicament News 1500: 6~7, 1996
- 4) 谷村 弘, 石本喜和男, 村上浩一, 他: 消化器外科手術後感染症の現状と対策。外科治療 68: 457~462, 1993
- 5) Horn R, Wong B, Kiehn T E, et al.: Fungemia in a cancer hospital: Changing frequency, earlier onset, and results of therapy. Rev Inf Dis 7: 646~655, 1985
- 6) Komshian S V, Uwaydah A K, Sobel J D, et al.: Fungemia caused by *Candida* species and *Toulopsis glabrata* in the hospitalized patient: Frequency, characteristics, and evaluation of factors influencing outcome. Rev Inf Dis 11: 379~390, 1989
- 7) Whimbey E, Kiehn T E, Brannon P, et al.: Bacteremia and fungemia in patient with neoplastic disease. Am J Med 82: 723~729, 1987
- 8) Fraser V J, Jones M, Dunkel J, et al.: Candidemia in a tertiary care hospital: Epidemiology, risk factors, and predictors of mortality. Clin Infect Dis 15: 414~421, 1992
- 9) Meyers J D: Fungal infection in bone marrow transplant patients. Semin Oncol 17: 10~13, 1990
- 10) Dean D A, Burchard K W: Fungal infection in surgical patients. Am J Surg 171: 374~382, 1996
- 11) Solomkin J S, Flohr A, Simmons R L: Indications for therapy for fungemia in postoperative patients. Arch Surg 117: 1272~1275, 1982

- 12) Yoshida M, Roth R I, Grunfeld C, et al.: Soluble (1→3)-β-D-glucan purified from *Candida albicans*: Biologic effect and distribution in blood and organs in rabbits. *J Lab Clin Med* 128: 103~114, 1996
- 13) 明田川純, 田村弘志, 田中重則: カプトガニ血液凝固 G 因子系を利用した (1→3)-β-D-グルカン類の比色定量法. 防菌防微誌 23: 413~419, 1995
- 14) Buchman T G, Rossier M, Merz W G, et al.: Detection of surgical pathogens by in vitro DNA amplification of a fungus specific gene. *Surgery* 108: 338~347, 1990
- 15) Kan V L: Polymerase chain reaction for the diagnosis of candidemia. *J Inf Dis* 168: 779~783, 1993
- 16) Crampin A C, Matthews R C: Application of the polymerase chain reaction to the diagnosis of candidosis by amplification of an HSP 90 gene fragment. *J Med Microbiol* 39: 233~238, 1993
- 17) Burgener-Kairuz P, Zuber J-P, Jaunin P, et al.: Rapid detection and identification of *Candida albicans* and *Torulopsis (Candida) glabrata* in clinical specimens by species-specific nested PCR amplification of a cytochrome P-450 lanosterol-*a*-demethylase (L1A1) gene fragment. *J Clin Microbiol* 32: 1902~1907, 1994
- 18) Jordan J A: PCR identification of four medically important *Candida* species by using a single primer pair. *J Clin Microbiol* 32: 2962~2967, 1994
- 19) Fujita S, Lasker B A, Lott T J, et al.: Microtitration plate enzyme immunoassay to detect PCR-amplified DNA from *Candida* species in blood. *J Clin Microbiol* 33: 962~967, 1995
- 20) Holmes A R, Cannon R D, Shepherd M G, et al.: Detection of *Candida albicans* and other yeasts in blood by PCR. *J Clin Microbiol* 32: 228~231, 1994
- 21) Shin J H, Nolte F S, Morrison C J: Rapid identification of *Candida* species in blood cultures by a clinically useful PCR method. *J Clin Microbiol* 35: 1454~1459, 1997
- 22) Haynes K A, Westerneng T J: Rapid identification of *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* and *C. krusei* by species-specific PCR of large subunit ribosomal DNA. *J Med Microbiol* 44: 390~396, 1996
- 23) Jordan J A: PCR identification of four medically important *Candida* species by using a single primer pair. *J Clin Microbiol* 32: 2962~2967, 1994
- 24) Miyakawa Y, Mabuchi T, Fukuzawa Y: New method for detection of *Candida albicans* in human blood by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 31: 3344~3347, 1993
- 25) Sandhu G S, Kline B C, Stockman L, et al.: Molecular probes for diagnosis of fungal infections. *J Clin Microbiol* 33: 2913~2919, 1995
- 26) Hopfer R L, Walden P, Settequist S, et al.: Detection and differentiation of fungi in clinical specimens using polymerase chain reaction (PCR) amplification and restriction enzyme analysis. *J Med and Veter Mycol* 31: 65~75, 1993
- 27) Barns S M, Lane D J, Sogin M L, et al.: Evolutionary relationship among pathogenic *Candida* species and relatives. *J Bacteriol* 173: 2250~2255, 1991
- 28) Niesters H G M, Goessens W H F, Meis J F M G, et al.: Rapid, polymerase chain reaction-based identification assays for *Candida* species. *J Clin Microbiol* 31: 904~910, 1993
- 29) Makimura K, Murayama S Y, Yamaguchi H: Specific detection of *Aspergillus* and *Penicillium* species from respiratory specimens by polymerase chain reaction (PCR). *Jap J Med Sci Biol* 47: 141~156, 1994
- 30) Makimura K, Murayama S Y, Yamaguchi H: Detection of a wide range of medically important fungi by the polymerase chain reaction. *J Med Microbiol* 40: 358~364, 1994
- 31) Deventer A J M, Goessens W H F, Belkum A, et al.: Improved detection of *Candida albicans* by PCR in blood of neutropenic mice with systemic candidiasis. *J Clin Microbiol* 33: 625~628, 1995
- 32) 植村浩一, 村山琢明, 上田剛三, 他: PCR 法による深在性真菌症の迅速診断法とその可能性. *Jpn J Med Mycol* 37: 85~90, 1996
- 33) Einsele H, Hebart H, Roller G, et al.: Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J Clin Microbiol* 35: 1353~1360, 1997
- 34) 紺谷忠司: 血中 *Candida albicans* の PCR 診断の開発と fungal translocation に関する臨床的研究. *和歌山医学* 49: 209~222, 1998
- 35) 角田卓也, 谷村 弘, 紺谷忠司, 他: 外科領域の難治性真菌感染症. *日本医真菌学会雑誌* 39: 203~209, 1998
- 36) 角田卓也, 谷村 弘: 外科領域におけるカンジダ血症の迅速診断. *Current Antifungal News* 16: 1~4, 1998
- 37) 谷村 弘, 角田卓也, 紺谷忠司, 他: 真菌感染症の早期診断と治療. *外科治療* 79: 729~738, 1998
- 38) Lee L G, Connell C R, Bloch W: Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucl Acids Res* 21: 3761~3766, 1993
- 39) Heid C A, Stevens J, Livak K J, et al.: Real time quantitative PCR. *Genome Research* 6: 986~994, 1996
- 40) Flahaut M, Sanglard D, Monod M, et al.: Rapid detection of *Candida albicans* in clinical samples by DNA amplification of common regions from *C. albicans*-secreted aspartic proteinase genes. *J Clin Microbiol* 36: 395~401, 1998
- 41) Alexander J W, Boyce S T, Babcock G F, et al.: The process of microbial translocation. *Ann Surg* 212: 496~512, 1990
- 42) 谷村 弘, 内山和久, 岡 正巳, 他: 門脈血行性胆道感染症. 今日感染症 (Current concepts in Infectious Diseases) 17: 12~15, 1998
- 43) Pittet D, Li N, Wenzel R P: Association of secondary and polymicrobial nosocomial bloodstream infections with higher mortality. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 12: 813~819, 1993
- 44) Pittet D, Monod M, Filthuth I, et al.: Contour-clamped homogeneous electric field gel electrophore-

- sis as a powerful epidemiologic tool in yeast infections. *Am J Med* 91: 256~263, 1991
- 45) Pittet D, Garbino J: Fungal infections in the critically ill. *Curr Opin Critic Care* 1: 369~380, 1995
- 46) 谷村 弘, 角田卓也, 馬庭芳朗, 他: 消化器外科における真菌感染症, 特に真菌性眼内炎について。腫瘍と感染 2: 607~610, 1989
- 47) 角田卓也, 谷村 弘, 馬庭芳朗, 他: TPN カテーテル敗血症と真菌性眼内炎。近畿地区 TPN 懇話会記録集 7: 26~29, 1991
- 48) Diviacco S, Norio P, Zentilin L, et al.: A novel procedure for quantitative polymerase chain reaction by coamplification of competitive templates. *Gene* 122: 313~320, 1992
- 49) Wingard J R, Merz W G, Rinaldi M G, et al.: Increase in *Candida krusei* infection among patients with bone marrow transplantation and neutropenia treated prophylactically with fluconazole. *N Eng J Med* 325: 1274~1277, 1991
- 50) Ruhnke M, Eigler A, Tennagen B, et al.: Emergence of fluconazole-resistant strains of *Candida albicans* in patients with recurrent oropharyngeal candidiasis and human immunodeficiency virus infection. *J Clin Microbiol* 32: 2092~2098, 1994
- 51) Guennee R L, Reynes J, Malliè M, et al.: Fluconazole- and itraconazole-resistant *Candida albicans* strains from AIDS patients: multilocus enzyme electrophoresis analysis and antifungal susceptibilities. *J Clin Microbiol* 33: 2732~2737, 1995
- 52) Walsh T J, Francesconi A, Sakai M, et al.: PCR and single-strand conformational polymorphism for recognition of medically important opportunistic fungi. *J Clin Microbiol* 33: 3216~3220, 1995
- 53) Williams D W, Wilson M J, Lewis M A O, et al.: Identification of *Candida* species by PCR and restriction spacer length polymorphism analysis of intergenic spacer regions of ribosomal DNA. *J Clin Microbiol* 33: 2476~2479, 1995
- 54) Maiwald M, Kappe R, Sonntag H G: Rapid presumptive identification of medically relevant yeasts to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Med Veter Mycol* 32: 115~122, 1994
- 55) Morace G, Sanguinetti M, Posteraro B, et al.: Identification of various medically important *Candida* species in clinical specimens by PCR-restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* 35: 667~672, 1997
- 56) Shin J H, Nolte F S, Morrison C J: Rapid identification of *Candida* species in blood cultures by a clinically useful PCR method. *J Clin Microbiol* 35: 1454~1459, 1997
- 57) Elie C M, Lott T J, Reiss E, et al.: Rapid identification of *Candida* species with species-specific DNA probes. *J Clin Microbiol* 36: 3260~3265, 1998
- 58) Shin J H, Nolte F S, Holloway B P, et al.: Rapid identification of up to three *Candida* species in a single reaction tube by a 5' exonuclease assay using fluorescent DNA probes. *J Clin Microbiol* 37: 165~170, 1999

New quantitative determination of *Candida albicans* by PCR and identification of *Candida* species by nested PCR in fungemia

Yoshinori Inada, Takuya Tsunoda and Hiroshi Tanimura

Second Department of Surgery, Wakayama Medical School, 811-1 Kimiidera, Wakayama 641-8510, Japan

Candida species are reported to be one of the major pathogens in serious infectious problems in the surgical treatment of cancer patients. Candidemia is diagnosed by blood culture, β -D-glucan, and *Candida* antigen assay in Japan. However, these methods are not satisfied in the view points of confidence and quickness. The polymerase chain reaction (PCR) has been applied to diagnose fungal infections. *Candida*-specific PCR was developed to detect fungi, especially medically important *Candida* sp., and proved to be clinically more reliable than conventional methods. However *Candida*-specific PCR provided only nonquantitative results and it was difficult to diagnose fungemia more precisely. Therefore, the present study was designed to investigate the real-time quantitative PCR for diagnosis and quantitative analysis of candidiasis. The *Candida albicans*-secreted aspartic proteinase (SAP) gene was used as the specific primer pair of in quantitative PCR. A specific fluorogenic probe was designed between the sequence of the specific primer pair of SAP genes. Real-time detection of the specific fluorescent signal in each PCR cycle indicated an essential information to quantify the number of *C. albicans*. This method was evaluated using human whole blood mixed with different numbers of *C. albicans* isolates. Almost no difference was seen between measured numbers analyzed within 4.5 hours and actual numbers. Furthermore, the present study was designed to investigate the nested PCR for identification of clinically important *C. albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* and *Candida krusei*, and it was successfully established in candidemia. Each specific nested primer pair was designed to identify individual fungi, between the sequence of the specific primer pair of the first PCR for the V4 region of the 18S ribosomal RNA gene of *Candida* sp.. Our quantitative determination of *C. albicans* using real-time PCR and identification of *Candida* sp. by nested PCR were confirmed to be applicable to fungemia and able to diagnose easily and sensitively quantify *C. albicans* or identify *Candida* sp. from blood in a short time.