ライフサイエンスイノベーションセンター
「平成２８年度重点プロジェクト研究および学内共同研究等研究費助成」

副鼻腔アスペルギルス症の簡易診断法の開発

研究代表者： 法木左近（腫瘍病理学部門・准教授）
共同研究者： 藤枝重治（耳鼻咽喉科・頭頸部外科学部門・教授）、堤内　俊喜（耳鼻咽喉科・頭頸部外科学部門・医員）

概　　要	
アスペルギルス症の診断は、病巣から無菌的に採取された検体での分離培養や、病理組織学的な確認の他に血清診断法、遺伝子診断法などがあるが、時間と費用とかがかかり、臨床の現場で早期の診断法が望まれている。一方、爪白癬診断キットは、皮膚糸状菌を抗原として作製したモノクローナル抗体を用いたキットで、昨年３月厚労省より体外診断薬として認可を受けている。しかし、このモノクローナル抗体は皮膚糸状菌のみならず糸状菌に属するアスペルギルス属にも一部反応する。そこで、我々は、この爪白癬診断キットを用いて、副鼻腔領域のアスペルギルス症の診断に応用できなか、検討した。 臨床症例は患者数が少なく、現時点での生の材料での検討はできていないが、以前、副鼻腔アスペルギルス症と診断された組織のホルマリン固定パラフィン切片を用いて検討した。	
関連キーワード	アスペルギルス、副鼻腔、モノクローナル抗体、爪白癬診断キット、簡易診断

研究の背景および目的

研究の背景
アスペルギルス症の診断は、病巣から無菌的に採取された検体での分離培養や、病理組織学的な確認により確定診断されるが、臨床診断としては、臨床症状や画像所見とともに、血清診断法、遺伝子診断法などをあわせてアルペルギルス症と診断される。しかし、診断が確定するまで時間がかかる。臨床的には、短時間で可能なアスペルギルス症診断法の確立が望まれている。
感染症の診断には、インフルエンザのように免疫クロマトグラフィー法を用いて診断を行うものが多いが、真菌感染に関してはこのような手法を用いたものは無かった。そこで、我々は皮膚糸状菌を抗原として作成したモノクローナル抗体をよる免疫クロマトグラフィーを用いた糸状菌検出キットを作製し、昨年（2016 年）3 月厚労省より、爪白癬診断の体外診断薬として認可を受けた。このモノクローナル抗体は皮膚糸状菌のみならず糸状菌に属するアスペルギルス属にも一部反応する。そこで、我々は、この爪白癬診断キットを用いて、副鼻腔領域のアスペルギルス症の診断に応用できないかどうか検討した。

研究の内容および成果

研究の方法と結果
副鼻腔アスペルギルス症が疑われる患者の鼻汁や菌塊などを、爪白癬診断キットを用いて診断が可能かどうか検討した。最初に、過去に、摘出された組織で、副鼻腔アスペルギルス症と病理診断されたホルマリン固定パラフィン包埋の組織を用いて、爪白癬診断キットで診断できるかどうかを検討した。
陽性コントロールとして、*Trichophyton* をサブロー寒天培地で純粋培養したものをストローで採取し 99%エタノール液および20%のホルマリン液に浸漬し、一晩固定した後、通常のパラフィン包埋ブロックを作製した。エタノール固定、ホルマリン固定、いずれも薄切片 5 枚を検体として使用した（検体①②）。また、*Trichophyton violacem* と *Microsprum fluflu* についても菌塊を検体として検討した（検体⑧⑨）*Aspergillus fumigatus* については、サブロー寒天番地で純粋培養した培養菌自体（検体⑪、*Trichophyton* と同様にストローで採取し99%エタノールで一晩固定したもの（検体⑩）と 20%ホルマリンで一晩固定したもの（検体⑫）、2 週間固定したもの（検体⑭）を検体として使用した。また、過去に副鼻腔アルペルギルス症と診断された５症例のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックか

ら薄切切片 5 枚を脱パラフィンしたものを臨床材料として検討した（検体③④⑤⑥⑦）。以上の検体をチューブにいれ、抗原抽出液を加え、撹拌し、テストストリップを浸し、5 分後に判定した。

結果：

結果を図１に示す。左から検体番号①から⑭までである。

陽性コントロールである *Trichophyton* については、エタノール固定パラフィン包埋およびホルマリン固定パラフィン包埋いずれの組織でも十分にこのキットで反応した（①②、矢印が反応したバンド）。*Trichophyton violacem* も同様に強陽性を示した（⑧）、*Microsprum fluflu* はやや弱いが陽性を示した（⑨）。

Aspergillus fumigatus については、菌体自体（⑪）、エタノールで一晩固定したもの（⑩）は陽性示した。ホルマリン固定したものも弱いながら陽性を示したが、固定時間が長いと反応は減弱した（⑫>⑭）。ホルマリン固定パラフィン包埋した *Aspergillus fumigatus* についても弱いながら陽性を示した（⑬）。

過去の症例のホルマリン固定パラフィン包埋では、５症例いずれも陰性であった（③④⑤⑥⑦）。

考察：

白癬菌種は、ホルマリン固定パラフィン包埋切片でもこのキットで陽性を示すことが分かった。また、*Aspergillus fumigatus* についても、このキットで陽性を示すが、ホルマリン固定により反応性は低下することが示された。

しかし、過去の臨床症例のホルマリン固定パラフィン包埋標本では 5 例いずれも陰性であった。これは、ホルマリン固定時間がある程度長く、また、組織に存在する菌量が少ないためと思われる。今後、ホルマリン固定前の新鮮な鼻汁や組織片での検討をさらに検討していく。

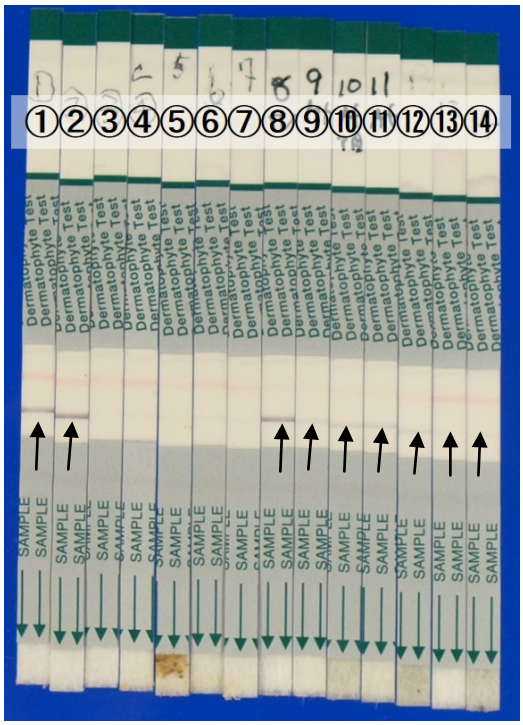

図１． 診断キットを用いた各種検体の反応
（矢印はは反応したバンドを示す）

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

臨床検体で、陽性結果が得られた場合、爪白癬診断キットの適応拡大が望めることになるため、本学が有する特許 P5167488「皮膚糸状菌の非加熱検出方法」の利用範囲の拡大として利用特許を申請する予定である。