

令和 4 年 10 月 28 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11757

研究課題名（和文）カンジダ卵黄抗体と蛍光色素を用いた新しいカンジダ検出法の開発、簡便化と迅速化

研究課題名（英文）Development for new Candida test

研究代表者

上川 善昭（Kamikawa, Yoshiaki）

鹿児島大学・医歯学域歯学系・准教授

研究者番号：30332901

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：従来の検査法の問題点を克服した独創的なカンジダ検査法、カンジダ卵黄抗体と蛍光色素を結合させたカンジダ卵黄抗体蛍光色素試薬を製作した、新しいカンジダ検査法を開発した。従来行われている口腔カンジダ症検査の種々の問題を克服した。特に、迅速かつ正確に診断結果を得ることができる。これにより治療開始までの経験的な治療や、治療開始時期の遅れや見切り発車の不要な投薬は解消されるので、医療経済の圧迫、さらに耐性菌出現がなくなる。新しいカンジダ検査法の検出感度は、培養法より高感度である。また、カンジダだけが蛍光発色するので判定は確実に簡便である。本研究は国際的にも独創的である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来行われている口腔カンジダ症検査は、種々の問題を抱えている。特に、カンジダ症の初期治療は診断結果を得るまでの間、経験的な治療となり、治療開始時期の遅れや見切り発車の不要な投薬が行われ、医療経済を圧迫し、さらに耐性菌出現の原因となっている。新しいカンジダ検査法の検出感度は、培養法でコロニー形成をしない濃度（0.1CFU/ml=100strains/ml）でも検知できるほどの高感度である。また迅速でカンジダだけが蛍光発色しているので判定は確実に簡便である。本研究に匹敵する報告は国の内外を検索しても見当たらず、本研究は独創的である。

研究成果の概要（英文）：We have developed a new Candida test method, which is a unique Candida test method that overcomes the problems of conventional test methods, and a Candida egg yolk antibody fluorescent dye reagent in which a Candida egg yolk antibody and a fluorescent dye are combined. It has overcome various problems of the conventional oral candidiasis test. In particular, the diagnostic result can be obtained quickly and accurately. As a result, empirical treatment until the start of treatment, unnecessary delays in treatment start time and unnecessary medication such as antibiotics are eliminated, and the pressure on the medical economy and the emergence of resistant bacteria are eliminated. The detection sensitivity of the new Candida test method is higher than that of the culture method. In addition, since only Candida produces fluorescent color, the determination is reliable and simple. This research is internationally original.

研究分野：口腔感染症

キーワード：口腔カンジダ症 カンジダ検査 蛍光色素 抗体検査

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

・従来の検査法の問題点を克服した独創的な新しいカンジダ検査法を開発する。

口腔カンジダ症は浅在性疾患だが、治療開始が遅れると口腔内に広範囲に進展し、免疫能の低下した患者ではカンジダ性腸炎や肺カンジダ症などの深在性カンジダ症を引きおこし、死の転帰をたどることもある、診断や治療に難渋する重要な日和見感染症の1つである。従来行われている口腔カンジダ症検査には、a. 培養法、b. 染色による顕微鏡検査、c. PCR法、d. 蛍光色素法などがあげられるが次に述べるような問題を抱えている。

- a. 培養法の確定診断には48時間以上必要で、初期治療の開始が遅れる原因となっている。
- b. PAS染色やGram染色による顕微鏡検査は診断にかかる時間は短いものの、その判定には熟練した技術が必要であり、誰でも行える検査ではない。
- c. PCR法は、感度は高いものの、検査には特殊な機材と技術が必要である。
- d. 蛍光色素法はセルロースに反応し感度は高いが、カンジダに特異的では無いので誤診が多い。その結果、カンジダ症の初期治療は診断結果を得るまでの間、経験的な治療となり、治療開始時期の遅れや見切り発車的な不要な投薬が行われ、医療経済を圧迫し、さらに耐性菌出現の原因となっている。確実な治療を行うには、迅速、高感度かつ特異度の高い新しいカンジダ検査法が開発が望まれている。

2. 研究の目的

従来法である培養法に代わる、迅速、高感度かつ特異度の高い、新しいカンジダ検査法を開発を目的とし、カンジダ卵黄抗体と蛍光色素を結合させたカンジダ卵黄抗体蛍光色素試薬を製作し、その有用性を示して臨床応用をめざすこととした。

3. 研究の方法

研究の対象は、鹿児島大学病院口腔外科を受診した患者のうち、口腔カンジダ症を疑ってカンジダ検査を行った患者とした。

抗体の作製法

生後5ヶ月、レグホン(鶏)の雌の胸部に無毒化した *Candida* 抗原を筋注した。6か月後に再度 *Candida* 抗原を胸部に筋注し、感染を確認後、2~6週以内に得られる卵を採取し、卵黄からニワトリ IgG を抽出して殺菌、乾燥を行った後に抗 *Candida* 抗体(抗 *C. albicans* 抗体抗 *C. glabrata* 抗体)を精製した。

抗体と蛍光色素標識を結合させた試薬の作製法

Quantum dot[®](モノクローナル標識キット -インビトロジェン社製-)を脱塩反応後、作製した抗体(抗 *Candida albicans* 抗体と抗 *Candida glabrata* 抗体)を還元反応し、それぞれ未反応物質をゲルフィルターにて除去した。除去後、各溶液を混合し反応させた。反応後、得られた蛍光標識した抗体を遠心し、濃縮した。

試薬の感度の検証(CFU: colony forming unit コロニー形成単位を用いた検索)法
各 *Candida* の生理食塩水懸濁液を作製し、各濃度(100CFU/ml、10CFU/ml、1CFU/ml、0.1CFU/ml)での *Candida* の集落形成能を検索するとともに、各濃度の懸濁液を抗 *Candida* 抗体と混和し、プレパラート上に塗布して蛍光顕微鏡にて観察し *Candida* の検出について検索した。

試薬の特異性の検証法

Candida 非感染者のプラークと口腔拭い液を染色しカンジダ以外は染色されないことを確認する。また、綿やガーゼなどの植物繊維を使用した医療用品が染色されないことを確認した。抗 *C. albicans* 抗体と抗 *C. glabrata* 抗体と *C. albicans*、*C. glabrata*、*C. tropicalis*

と *C. parapsilosis* との凝集反応を検討して特異性を検索した。

試薬の *Candida* 属種間での特異性の検証法

各抗 *Candida* 抗体が *Candida* 属種間において特異的であるかを確認するため、各抗体を用い、*C. albicans* と *C. glabrata*、*C. dubliniensis*、*C. parapsilosis* の染色を行う。その他の真菌についても検索した。対象者に知り食塩水 10ml を用いて 30 秒間含嗽してもらい、その全量を採取した。それを 5 分間遠心、濃縮し、上澄み液を廃棄し全量 1ml となるように調整しこれを用いて従来の標準法である培養法と、培養法との感度の比較、培養法との特異度の比較、について比較検討しその実用性を検討した。

4. 研究成果

対象

対象は、男性 93 例、女性 256 例の計 349 例だった。(表 1)

カンジダ検出

培養法にてカンジダ集落の形成を認めたのは 310 例だった。PCR 法にてカンジダを陽性と判断したのは 349 例だった。新しいカンジダ検査法にて陽性と判断したのは 349 例だった。

(表 2)

検出属種の内訳

PCR 法では、検出されたカンジダ属種は *Candida albicans* が 292 例、*C. glabrata* が 142 例、*C. tropicalis* が 48 例だった。重複を含む。

新しいカンジダ検査法で検出されたカンジダ属種は *C. albicans* が 290 例、*C. glabrata* が 140 例、*C. tropicalis* が 44 例だった。重複を含む。

培養法で検出されたカンジダ属種は、*C. albicans* が 272 例、*C. glabrata* が 132 例、*C. tropicalis* が 39 例だった。重複を含む。(表 3)

検出に要した時間

培養法では 24 時間を要し、PCR 法では 6 時間を要した。新しいカンジダ検査法では 10 分間であり培養法、PCR 法より迅速であった。

感度、特異度

PCR 法に対する新しいカンジダ検査法の感度は 98% で培養法の 89.9% を上回り、特異度は 95% と培養法の 82.1% を上回っていた。

研究のまとめ

従来法である培養法、PCR 法など各種の検査法との比較を行った。結果は新しいカンジダ検査法の感度は 98%、特異度は 95% と従来法(培養法)に比較して高い値を認めた。さらに、検査に要する時間は 10 分と従来の培養法の 24 時間以上、PCR 検査法の 6 時間に比へて飛躍的に短くなった。また、検査に要する手技は簡便で検体に試薬を滴下して蛍光顕微鏡で観察するだけでカンジダが存在すれば蛍光を発するので、特別な経験や診断技能を必用とせず判別は容易だった。今回、われわれは培養法に代わる、迅速、高感度かつ特異度の高い、新しいカンジダ検査法の開発を目的とし、カンジダ卵黄抗体と蛍光色素を結合させたカンジダ卵黄抗体蛍光色素試薬を製作し、その有用性が示された。この、新しいカンジダ検査法は臨床応用が可能であることが示唆された。

表 1

対象(349)

男性： 93

女性： 256

表 2

	培養法	PCR 法	新しいカンジダ検査法
カンジダ陽性	310	349	349
カンジダ陰性	39	0	0

表 3

検出されたカンジダ属種の内訳

	PCR 法		新しいカンジダ検査法		培養法
<i>C. albicans</i>	290 例	<i>C. albicans</i>	290 例	<i>C. albicans</i>	272 例
<i>C. glabrata</i>	140 例	<i>C. glabrata</i>	140 例	<i>C. glabrata</i>	132 例
<i>C. topocalis</i>	44 例	<i>C. topocalis</i>	44 例	<i>C. topocalis</i>	39 例
重複を含む。		重複を含む。		重複を含む。	

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	永山 知宏 (Nagayama Tomohiro) (20514657)	鹿児島大学・鹿児島大学病院・医員 (17701)	
研究分担者	上川 泰子 (築瀬泰子) (Kamikawa Yasuko) (70253903)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・その他 (17701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関