

令和 3 年 10 月 22 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19616

研究課題名(和文)多白血球血漿を用いた D-glucan測定による深在性真菌症診断法の新規開発

研究課題名(英文) new development of diagnostic method for deep seated mycoses by BDG measurement using multiple leukocyte plasma

研究代表者

菅 重典(kan, shigenori)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：80633081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：真菌による敗血症は依然死亡率が高く、その要因を解消するために、HES製剤を用いて多白血球血漿(LRP)を作成し、偽陽性成分のBDGのみでなく、菌体成分も含んだBDG量を測定する方法を考案した。従来法である多血小板血漿(PRP)と新規法であるHES製剤を用いた多白血球血漿(LRP)のBDG量を測定することで精度向上が可能かを基礎的に検討した。BDGratio(LRP/PRP-BDG)を用いることで検査精度向上が可能であり、しいては救命率の向上に寄与すると考える。臨床研究においてもBDGratioが有意に精度が高く、今後さらに臨床研究を進め、学会誌へ投稿し、特許申請予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これらの感度・陽性的中率を改善することで診断率が向上し、死亡率の改善が認められた。そこで、現行法で検体試料として用いられている多血小板血漿(Platelet-Rich Plasma以下PRP)単独測定ではなく、我々が考案した多白血球血漿(Leukocyte-Rich-Plasma以下LRP)を検体試料として併用し、BDG-ratio(LRPのBDG/PRPのBDG量)を算出することで疑陽性および偽陰性を同時に解消し、より高精度の検査とすることで診断率の向上、しいては救命率の向上が可能であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Severe fetal sepsis still has a high mortality rate, and in order to solve this factor, multilocellular plasma (LRP) was prepared by using HES preparation, and not only BDG of false positive components but also BDG amount containing bacterial components was devised. We investigated basically whether or not the accuracy can be improved by measuring the BDG amount of multi leukocyte plasma (LRP) using conventional platelet rich plasma (PRP) and a new method, HES preparation. We believe that the use of BDGratio (LRP / PRP - BDG) can improve the accuracy of examination, which in turn contributes to the improvement of the life expectancy. The future clinical research will be advanced and patent application is planned.

研究分野：感染症

キーワード：真菌血症 敗血症 D glucan エンドトキシン ワコー法

## 1. 研究開始当初の背景

Sepsis とは細菌,真菌,ウイルスなどにより,全身性炎症症候群を引き起こした病態である.これらは容易に多臓器不全,ショック状態に進展し,死亡率は 40%前後に達する.その中で真菌血症の割合は 10-20%を占め,血液から真菌が培養された場合,死亡率は 50%前後との報告がある.さらに真菌性肺炎の場合,死亡率は 80%にのぼる.その要因として真菌感染による様々な生体反応の他に,以下の大きな要因が考えられる.現在,日本で開発され,最も広く用いられている血清学的補助診断として,4 種類の BDG 測定がある.しかし,各種検査により感度や陽性的中率が優れているとは言い難い.この原因は BDG が医療器材(透析膜,ガーゼ)や薬剤(アルブミン製剤,グロブリン製剤)にも混在し,現行法では真菌血症と同様に反応し疑陽性となるためである.それに加え,現在の検体試料として多血小板血漿を使用しているが,真菌や白血球が貪食した菌体は殆ど含まれず,偽陰性が多くなるためである.

## 2. 研究の目的

これらの感度・陽性的中率を改善することで診断率が向上し,死亡率の改善が見込まれる.そこで,現行法で検体試料として用いられている多血小板血漿(Platelet-Rich Plasma 以下 PRP)単独測定ではなく,我々が考案した多白血球血漿(Leukocyte-Rich-Plasma 以下 LRP)を検体試料として併用し,BDG-ratio(LRP の BDG/PRP の BDG 量)を算出することで疑陽性および偽陰性を同時に解消し,より高精度の検査とすることで診断率の向上,しいては救命率に直結するものと考えられる.

## 3. 研究の方法

### (1)真菌と白血球の結合を確認する

真菌が白血球に結合している事,または内部にも存在するという大前提を確認実験する.白血球への L 真菌結合を,白血球抗体,真菌抗体を用い,フローサイトメトリーによる解析を行う.またバイオイメージング等で病理学的細菌学的検証を行う.

(2)健常者および真陽性検体・疑陽性検体での -D グルカン値の比較検討と複数の健常者検体における PRP,LRP -D グルカン値の比較検討を行う.さらに,健常者全血に真菌やアルブミン製剤を混注し,37 で 2 時間混和後した真陽性検体および偽陽性検体を作成し PRP,LRP の BDG 量を比較検討する.さらに BDG-ratio を算出し検討する.またこれらは臨床研究への予備実験となる.真菌は真菌血症で最も多い株である *Candida . albicans* で行う

(3)Spsis 患者における -D グルカン値の比較検討,統計解析.

当施設へ搬入となった患者,または院内で発症した全身性炎症症候群患者より検体を採取し,PRP,LRP の -D グルカン値値を比較検討し BDG-ratio を算出する.統計解析(SPSS を使用)を行い ROC 曲線を作成し cut-off 値を設定し,感度,特異度および陽性的中率,陰性的中率を求め,従来の測定法と比較検討する.

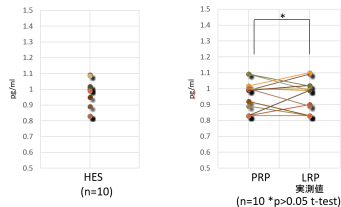
### 真菌血症患者における症例検討

真菌血症を呈した数名の患者を定期的に検体採取し,PRP,LRP -D グルカン値と共に CRP(急性炎症反応タンパク),白血球,使用抗生剤,ICU チャートをもとに,症例検討を重ね,LRP の有用性について検討する.

#### 4. 研究成果

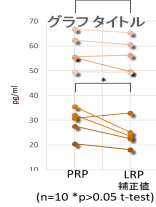
(1)真菌液 (*Candida . albicans*) と健常者血液に混和した真陽性検体を作成し,37 度で2時間混和後の PRP と LRP の -D グルカン値を比較した . 共に陽性値であったが,有意差を認めなかった .

HES製剤のBDG量

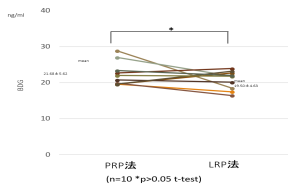


(2)アルブミン製剤 (25%アルブミン®) およびガーゼ絞り液と健常者血液を混和した疑陽性検体を作成し,37 度で2時間混和後のPRPとLRPの -Dグルカン値を比較した . 共に陽性値であるが,有意差を認めた .

アルブミン製剤添加血液におけるPRP-LRPのBDG量の比較

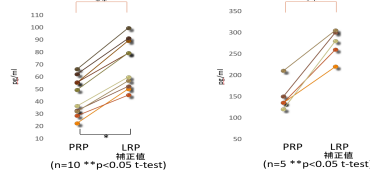


③ガーゼ浸出液添加血液におけるPRP-LRP法のBDG比較



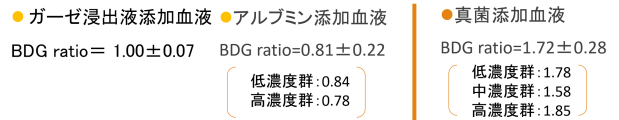
(3)BDG-ratio(LRP-BDG 量 /PRP-BDG 量)を算出した . 偽陽性検体では1.0 前後であったのに対し,真陽性検体では1.5 前後であった .

結果④  
真菌液添加血液におけるPRP-LRPのBDG量の比較

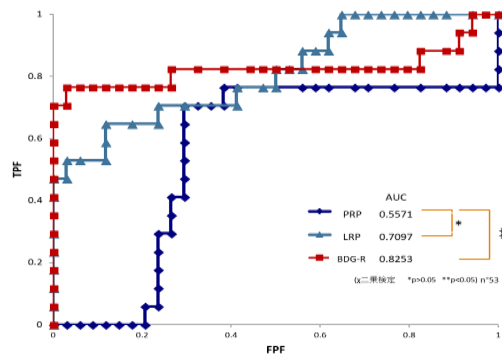
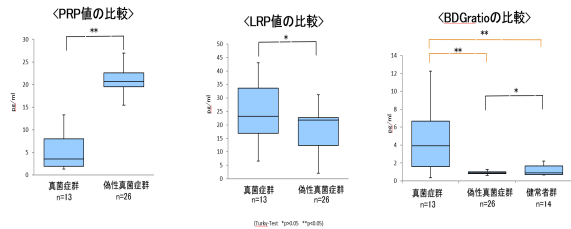


BDG ratio

$$\text{BDG ratio} = \frac{\text{LRP BDG量}}{\text{PRP BDG量}}$$



(4)臨床研究における精度比較において,LRP,PRP,BDGratio では,AUC においてBDGratioが最高値となった .BDGratioのカットオフ値は2.1 であった .



	CutOff値	感度	特異度	陽性的中率	陰性的中率
PRP	11.2	70.0%	70.6%	42.5%	54.4%
LRP	23.2	64.3%	88.2%	62.4%	72.6%
BDGratio	2.1	76.4%	97.0%	85.3%	86.6%

研究成果をエンドトキシン治療研究会,日本集中治療医学会,日本救急医学会にて発表した . 現在日本感染症学会の論文形成に向けて執筆中である .

5 . 主な発表論文等

(研究代表者,研究分担者及び連携研究者  
には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

Basic Verification of  $\beta$ -D Glucan in  
Leukocyte-Rich Plasma for the Diagnosis of  
Deep Mycosis

Shimoyama K, Kan S, Takahashi G, Morino G,

Yamada Y, Inoue Y, Inada K, Endo S.

Infect Chemother. 2021 Mar;53(1):75-83.

〔学会発表〕(計3件)

菅 重典,深在性真菌症における  
Leukocyte-Rich-Plasma による  
新規  $\beta$ -D gluca 測定,エンドトキシン治  
療研究会,2018

下山 賢,深在性真菌症における  
Leukocyte-Rich-Plasma を用いた Wako  
法の新規測定法,日本救急医学会,2017

菅 重典,Leukocyte-Rich-Plasma によ  
る  $\beta$ -D glucan 測定の基礎検証と症例,  
日本集中治療医学会,2016

〔図書〕(計1件)

高橋 学,菅 重典,ヘルス出版,感染制御の最  
前線,救急医学 9月号,2015

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.iwateqq.com/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

菅 重典 (KAN Shigenori)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号: 80633081

(3)連携研究者

稲田 捷也 (INADA Katuya)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号: 80048446

高橋 学 TAKAHASHI Gaku)

岩手医科大学医学部・助教

研究者番号: 6453304

丹保 亜希仁 (ANPO Akihito)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号: 831524

小鹿 雅博 (KOIKA Masahiro)

岩手医科大学医学部・助教

研究者番号: 4347878