

原著

小児の侵襲性肺真菌症における診断方法と検査特性

米田 立¹⁾ 舟越 葉那子¹⁾ 石井 翔¹⁾ 荒木 孝太郎¹⁾
村井 健美¹⁾ 福岡 かほる¹⁾ 相澤 悠太¹⁾ 堀越 裕歩¹⁾

要旨 本邦の小児における侵襲性肺真菌症の検査診断に関する報告は少なく、その特徴を後方視的に検討した。2010年3月～2017年3月の侵襲性肺真菌症の15例を対象とした。真菌の内訳はアスペルギルス属が10例、接合菌が2例、*Pneumocystis jirovecii*が2例であった。清潔部位の培養検査で診断した確定例は3例であった。推定例は10例で、うち6例は抗原検査で診断した。アスペルギルス属では、培養検査で診断した症例は3例で、うち1例はガラクトマンナン抗原が陰性、2例は(1→3)-β-D-グルカン(beta-D-glucan:BDG)が陰性であった。ガラクトマンナン抗原で診断した症例は5例で、うち3例はBDGが陰性であった。Polymerase chain reaction(PCR)法で診断した症例は2例で、いずれも真菌抗原は陰性であった。*P. jirovecii*は2例ともBDGが300pg/mL以上であり、著増しやすい傾向が示唆された。侵襲性肺真菌症は抗原検査が陰性であっても培養検査やPCR法が陽性となる例もあり、複数の検査を組み合わせることで総合的に診断することが重要であると考えられた。

はじめに

侵襲性肺真菌症は主に免疫不全患者や血液悪性腫瘍の患者に発症する、致死率の高い呼吸器感染症の一つである¹⁾。早期診断と治療が望ましいが、確定診断が難しい疾患であり、清潔部位から得られた検体の病理学的検査、あるいは培養検査で真菌を証明することが必要とされる²⁾。しかし血液をはじめとする清潔部位から真菌が検出されることは稀であり、生検などの侵襲度の高い処置も患者背景や状態を考慮すると実施できない場合が多い。一方でガラクトマンナン(galactomannan:GM)抗原、(1→3)-β-D-グルカン(beta-D-glucan:BDG)、クリプトコッカス抗原などの真菌抗原検査は、補助的な検査法ではあるが侵襲が少なく、簡便に測定できるという利点がある。また polymerase chain reaction

(PCR)法などの核酸増幅法は、ごく微量でも菌を検出できることから、感染症領域で広く用いられるようになってきている。成人領域では、侵襲性真菌感染症における抗原検査やPCR法などの検査特性に関するまとまった報告はあるが、小児科領域における報告は限られている。小児における侵襲性肺真菌症の診断方法と検査特性の特徴を明らかにするために、当院における侵襲性肺真菌症について後方視的に検討を行った。

1. 対象と方法

2010年3月～2017年3月の間に東京都立小児総合医療センターに入院し、侵襲性肺真菌症として診療を受けた症例を、電子診療録を用いて後方視的に検討した。画像検査で肺病変がある症例のうち、①血液、胸水、気管支肺胞洗浄液(bron-

Key words : 侵襲性肺真菌症, 侵襲性真菌感染症, ガラクトマンナン抗原, (1→3)-β-D-グルカン

1) 東京都立小児総合医療センター感染症科

連絡先: 米田 立 〒183-8561 東京都府中市武蔵台 2-8-29

東京都立小児総合医療センター感染症科

表1 EORTC/MSGによる侵襲性真菌感染症の診断基準（一部抜粋）

確定例	清潔部位から得られた検体の病理組織検査や細胞診で、菌糸や酵母状構造を認め、組織破壊を伴っている。あるいは培養検査で真菌の存在が証明される
推定例	以下の3項目の全てを満たす ① 宿主基準 好中球減少、同種幹細胞移植、長期のステロイド使用 免疫抑制薬の使用、重症免疫不全 ② 臨床基準：以下の感染を示す症状や画像所見を認める 真菌による下気道感染、気管気管支炎、鼻副鼻腔感染、中枢神経感染、播種性カンジダ症 ③ 真菌学的基準 直接法：喀痰、気管支肺胞洗浄液などの検体の細胞診や培養検査で真菌を証明 間接法：血清、気管支肺胞洗浄液、髄液などの検体から真菌抗原を検出
可能性例	上記の①、②を満たす

EORTC/MSG: European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group

choalveolar lavage fluid: BAL), 肺組織の検体から培養検査, 病理検査, PCR法によって真菌が検出された, または②血液検査で真菌抗原が陽性であった症例を対象とした. 電子診療録を用いて, 年齢, 性別, 基礎疾患, 起因真菌, 診断方法, 検査部位, 真菌抗原, 画像所見, European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG)による侵襲性真菌感染症ガイドラインを基準にした診断(表1), 転機について検討を行った. 真菌抗原はガラクトマンナン抗原(プラテリア®アスペルギルス, バイオ・ラッドラボラトリーズ, 東京), (1→3)-β-D-グルカン(ファンギテック®GテストMKII「ニスイ」, 日水製薬, 東京), クリプトコックス抗原(セロダイレクト®‘栄研’クリプトコックス, 栄研化学, 栃木)について評価した. ガラクトマンナン抗原についてはカットオフインデックス0.5以上を陽性とし, BDGは20pg/mLを超えるものを陽性とした. PCRに関してはMinElute PCR Purification kit(QIAGEN, 東京)を用いてRNA抽出を行い, プロンプ法リアルタイムPCRをPCR Thermal Cycler Dice®(タカラバイオ, 滋賀)で実施した. また, プライマーはサイメツ

表2 患者背景

	N(%)
症例数	15
年齢: 中央値 (IQR)	8歳(4か月~12歳)
性別	
男児	12 (80)
女児	3 (20)
基礎疾患	
血液腫瘍疾患	8 (53)
原発性免疫不全症	4 (26) (うち2例は疑い)
その他	3 (20)
EORTC/MSGによる診断	
確定例	3 (20)
推定例	10 (67)
可能性例	2 (13)
死亡	6 (40)

ド社(東京)の試薬を用いた. 本研究は東京都立小児総合医療センター倫理委員会の承認を受けた(H29b-66).

II. 結 果

電子診療録上, 組み入れ基準を満たした15例について検討を行った.

1. 患者背景(表2)

15症例のうち男児が12例(80%), 年齢中央値

表3 侵襲性アスペルギルス感染症の各症例の診断方法と検査所見

症例	年齢(歳) /性別	基礎疾患	真菌名	検査	部位	GM 抗原	BDG (pg/mL)	胸部 CT	転帰	診断
1	16/男	CAEBV	<i>A. viridinutans</i>	培養・ 抗原	胸水・ 血液	+	>300	結節影	死亡	確定例
2	14/女	なし	<i>A. fumigatus</i>	培養・ 抗原	肺組織・ 血液	+	-	空洞 形成	生存	確定例
3	3/男	CGD	<i>A. nidulans</i>	培養	BAL	-	-	浸潤影	生存	推定例
4	0/男	HLH	<i>Aspergillus</i> sp	抗原	血液	+	>300	結節影	生存	推定例
5	10/男	T-LBL	<i>Aspergillus</i> sp	抗原	血液	+	23.5	結節影/ 浸潤影	死亡	推定例
6	5/男	ALL	<i>Aspergillus</i> sp	抗原	血液	+	-	結節影	生存	推定例
7	8/男	PID (分類不能型)	<i>Aspergillus</i> sp	抗原	血液	+	-	浸潤影	生存	推定例
8	11/男	ALD	<i>Aspergillus</i> sp	抗原	血液	+	-	浸潤影	生存	推定例
9	9/男	ALL	<i>Aspergillus</i> sp	PCR	BAL	-	-	浸潤影	死亡	可能性例
10	17/男	AML	<i>Aspergillus</i> sp	PCR	肺組織	-	-	結節影/ 浸潤影	死亡	可能性例

GM：ガラクトマンナン BDG：(1→3)-β-D グルカン

CAEBV：慢性活動性EBウイルス感染症 CGD：慢性肉芽腫症 HLH：血球貪食症候群 T-LBL：Tリンパ芽球性リンパ腫 ALL：急性リンパ性白血病 PID：原発性免疫不全症候群 ALD：副腎白質ジストロフィー AML：急性骨髄性白血病

は8歳(inter-quartile range：4か月～12歳)であった。基礎疾患は血液腫瘍疾患が8例(53%)、原発性免疫不全症が4例(26%：うち2例は疑い)、その他が3例(20%)であった。EORTC/MSGの診断基準で確定例は3例(20%)、推定例は10例(67%)、可能性例は2例(13%)であった。死亡例は6例(40%)であり、アスペルギルス属が4例、接合菌が2例であった。

2. 起因真菌(図)

検出された真菌はアスペルギルス属が最多で10例(*A. fumigatus* 1例, *A. nidulans* 1例, *A. viridinutans* 1例, 他7例は属名のみ)、接合菌が2例(*Rhizopus microsporus* 1例, *Cunninghamella bertholletiae* 1例)、*Pneumocystis jirovecii* が2例、*Cryptococcus neoformans* が1例であった。

3. 診断方法(表3, 表4)

侵襲性アスペルギルス感染症では、培養検査で

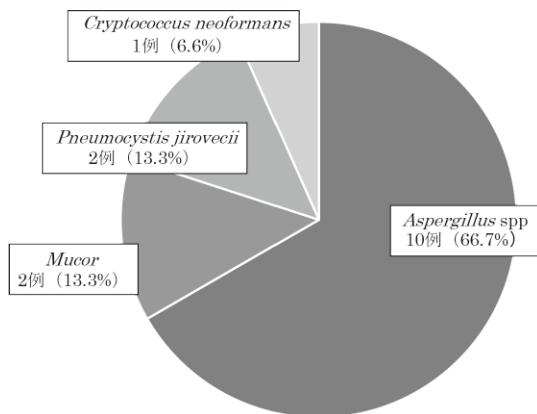


図 起因真菌

診断した症例は3例で、そのうち2例はそれぞれ胸水、肺組織から検出され確定例となった。もう1例はBALから検出された推定例であり、ガラクトマンナン抗原は陰性であった。ガラクトマンナン抗原で診断した症例は5例で、そのうち3例はBDG陰性であった。PCR法で診断した症例は2例で、いずれも抗原検査は陰性であった。

表4 アスペルギルス属以外の侵襲性肺真菌症の診断方法と検査所見

症例	年齢(歳) /性別	基礎疾患	真菌名	検査	部位	クリプト コックス抗原	BDG (pg/mL)	胸部 CT	転帰	診断
11	0/男	PDHC 欠損症	<i>Rhizopus microspores</i>	培養	血液	ND	ND	ND*	死亡	確定例
12	19/男	T-ALL	<i>Cunninghamella bertholletiae</i>	培養	BAL	—	—	結節影	死亡	推定例
13	0/女	PID 疑い	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	細胞診	BAL	—	>300	スリガラス 陰影	生存	推定例
14	0/男	PID 疑い	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	細胞診・ PCR	BAL	—	>300	スリガラス 陰影	生存	推定例
15	1/女	ITP AIHA	<i>Cryptococcus neoformans</i>	抗原	血液	+	—	浸潤影	生存	推定例

PDHC：ピルビン酸脱水素酵素複合体 T-ALL：T細胞性急性リンパ性白血病 ITP：免疫性血小板減少症

AIHA：自己免疫性溶血性貧血 ND：No Data

*胸部 X 線で両肺野の透過性低下を認める。

ムーコル症は2例で、いずれも死亡後に培養検査によって診断された。そのうち1例は確定例であり、血液検体から *Rhizopus microspores* が検出された。

ニューモシスチス肺炎は2例とも BAL の細胞診によって診断され、いずれも BDG は 300 pg/mL 以上と異常高値を示した。クリプトコックス症は1例のみで、クリプトコックス抗原によって診断された。

III. 考 察

侵襲性真菌感染症は、血液腫瘍疾患で化学療法中または移植後の患者、原発性免疫不全症や後天性免疫不全症の患者に生じることが多い感染症であり¹⁾、本研究でもほとんどの症例がそれらの基礎疾患を有していた。また本邦の小児領域における侵襲性真菌感染症のサーベイランスにおいても同様の傾向が報告されている²⁾。

EORTC/MSG の基準によると確定例は3例のみで、それぞれ胸水、肺組織、血液の培養から真菌が検出され、確定診断となった。EORTC/MSG の基準では、清潔部位の培養検査で真菌が検出されること、または病理学的検査による真菌の証明が必要とされている。これらの検査のために通常は生検が必要であるが、侵襲性真菌感染症が疑われる患者にとっては侵襲の大きい処置である。その

ため生検が実施されず、確定診断に至らない症例が多いのが現状と考えられる。推定例は10例であり、①宿主因子、②臨床基準を満たしたうえで、6例は抗原検査によって、4例は BAL の細胞診あるいは培養検査によって診断された。可能性例はアスペルギルス属の2例で、PCR法によって診断された。PCR法は侵襲性真菌感染症の診断基準に含まれていないが³⁾、侵襲性アスペルギルス感染症に対するPCR法の診断精度を検討したメタアナライシスでは、感度84%、特異度76%と報告されており⁵⁾、その有用性が期待されている。

アスペルギルスは、侵襲性真菌感染症の起因真菌のうちカンジダに並んで最も多く検出される真菌の一つであり⁴⁾、本研究で対象となった侵襲性肺真菌症15例においても起因真菌として最多であった。ガラクトマンナンはアスペルギルスに特有の細胞壁構成成分であり、ガラクトマンナン抗原検査は侵襲性アスペルギルス感染症の早期診断のために開発された検査として利用されている。小児における検査診断能は良好で、多くの文献で特異度は87%以上⁶⁾、感度は65.7~100%と報告されている^{7,8)}。

一方で本研究では、培養検査、PCR法で診断した侵襲性アスペルギルス感染症の5例に限ると、ガラクトマンナン抗原の陽性率は40%であり、既報と比較すると低い結果であった。その理由の一

つとしてガラクトマンナン抗原が陰性であった症例のうち1例は *A. nidulans* が検出された慢性肉芽腫症であり、ガラクトマンナン抗原が偽陰性であった可能性が考えられる。慢性肉芽腫症患者では *A. nidulans* が検出されやすく、さらにガラクトマンナン抗原が偽陰性となりやすいことが報告されている^{9,10)}。さらに抗真菌薬が先行投与されている場合、ガラクトマンナン抗原の感度が低下することが報告されており¹¹⁾、本研究でもガラクトマンナン抗原が陰性であった3例は、全て診断時に抗真菌薬投与下であった(症例3:イトラコナゾール, 症例9:アムホテリシンB, 症例10:ポリコナゾール)。

侵襲性アスペルギルス感染症の胸部CT所見については、結節影、空洞形成、halo sign, air crescent signなどが知られているが、成人と小児ではその頻度が異なる。成人の侵襲性アスペルギルス感染症において、空洞形成、air crescent signを呈する頻度はそれぞれ約50%、40%と報告されているが¹²⁾、Burgosらによると小児ではそれぞれ24.5%、2.2%であり、成人と比較して少数であったと報告している¹³⁾。本研究でも空洞形成は1例(10%)であり、air crescent signを呈した症例はなかった。小児では、空洞形成やair crescent signなど侵襲性アスペルギルス感染症に特徴的な画像所見を示す症例が多くないことに留意しなければならない。

また、胸部CTの異常所見は病初期から認められることが多く、侵襲性アスペルギルス感染症が疑われた場合には画像検査として胸部CTが推奨されている³⁾。一方でガラクトマンナン抗原は病初期にはしばしば検出されないことがある。Weisserらによると、侵襲性アスペルギルス感染症患者においてCTで異常所見が指摘される前にガラクトマンナン抗原が陽性を示したのは10%であったと報告している¹⁴⁾。初期においてはガラクトマンナン抗原が陰性であっても侵襲性アスペルギルス感染症を否定することはできず、胸部CTを実施すべきと考えられる。

BDGは真菌に特有の細胞壁構成成分であり、侵襲性真菌感染症の抗原検査法として用いられている。侵襲性真菌感染症の診断基準にも含まれてお

り、血液悪性腫瘍患者や移植後患者などの侵襲性アスペルギルス感染症のハイリスク患者に対して検査が推奨されている⁴⁾。125例の侵襲性真菌感染症を対象としたBDGの診断精度の検討では、感度88%、特異度59.5%と報告されている¹⁵⁾。一方でBDGのカットオフ値を80pg/mLに設定した場合、侵襲性アスペルギルス感染症の診断時に48%の患者でBDGが陰性であり、BDGによる侵襲性アスペルギルス感染症の除外が難しいことが報告されている¹⁶⁾。また、ガラクトマンナン抗原と同様にBDGも抗真菌薬投与下では偽陰性が生じうるとされている¹⁷⁾。本研究でも侵襲性アスペルギルス感染症と診断した10例のうち7例が診断時にBDG陰性であり、その約半数は抗真菌薬が先行投与されていた。また、ムーコル症やクリプトコックス症においてもBDGが上昇しないことが知られており¹⁷⁾、本研究でもムーコル症1例(もう1例は未測定)、クリプトコックス症1例においてBDGの上昇はみられなかった。

ニューモシスチス肺炎における血清BDGの診断精度は良好であり、主に成人を対象としたメタアナライシスでは、感度94.8%、特異度86.3%と報告されている¹⁸⁾。一方で小児科領域からの報告は少ない。小児のニューモシスチス肺炎に関する3例のケースシリーズでは、血清BDGは3例とも500pg/mL以上であったと報告している¹⁹⁾。本研究においてもニューモシスチス肺炎と診断した2例はいずれも血清BDGが300pg/mL以上と異常高値を示しており、ニューモシスチス肺炎ではBDGが著増しやすい可能性が示唆される。

結 語

侵襲性アスペルギルス感染症は、複数の検査で同時に陽性所見を示した症例は少なかった。また、ムーコル症やクリプトコックス症ではBDGが上昇しないことが知られているが、ニューモシスチス肺炎では著増しやすい傾向が示唆された。侵襲性肺真菌症は、抗原検査が陰性であっても培養検査やPCR法が陽性となる例もあり、複数の検査を組み合わせて総合的に診断することが重要であると考えられた。

本論文の要旨は第49回日本小児感染症学会学術集会で報告した。

日本小児感染症学会の定める利益相反に関する開示事項はありません。

文 献

- 1) De Pauw B, et al : Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis* 46 : 1813-1821, 2008
- 2) Mori M : Nationwide survey of treatment for pediatric patients with invasive fungal infections in Japan. *J Infect Chemother* 19 : 946-950, 2013
- 3) Patterson TF, et al : Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 63 : e1-e60, 2016
- 4) Arvanitis M, et al : PCR in diagnosis of invasive aspergillosis : a meta-analysis of diagnostic performance. *J Clin Microbiol* 52 : 3731-3742, 2014
- 5) Pana ZD, et al : Epidemiology of Invasive Fungal Disease in Children. *J Pediatric Infect Dis Soc* 6 (Suppl 1) : S3-11, 2017
- 6) Fisher BT : The Role of Biomarkers for Diagnosis of and Therapeutic Decisions Related to Invasive Aspergillosis in Children. *Curr Fungal Infect Rep* 7 : 7-14, 2013
- 7) Hayden R, et al : Galactomannan antigenemia in pediatric oncology patients with invasive aspergillosis. *Pediatr Infect Dis J* 27 : 815-819, 2008
- 8) Loeffler J, et al : Prospective Biomarker Screening for Diagnosis of Invasive Aspergillosis in High-Risk Pediatric Patients. *J Clin Microbiol* 55 : 101-109, 2016
- 9) Henriët S, et al : Invasive fungal infections in patients with chronic granulomatous disease. *Adv Exp Med Biol* 764 : 27-55, 2013
- 10) Henriët SS, et al : *Aspergillus nidulans* and chronic granulomatous disease : a unique host-pathogen interaction. *J Infect Dis* 206 : 1128-1137, 2012
- 11) Marr KA, et al : Antifungal therapy decreases sensitivity of the *Aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay. *Clin Infect Dis* 40 : 1762-1769, 2005
- 12) Geffer WB, et al : Invasive pulmonary aspergillosis and acute leukemia: limitations in the diagnostic utility of the air crescent sign. *Radiology* 157 : 605-610, 1985
- 13) Burgos A, et al : Pediatric invasive aspergillosis : a multicenter retrospective analysis of 139 contemporary cases. *Pediatrics* 121 : e1286-1294, 2008
- 14) Weisser M, et al : Galactomannan does not precede major signs on a pulmonary computerized tomographic scan suggestive of invasive aspergillosis in patients with hematological malignancies. *Clin Infect Dis* 41 : 1143-1149, 2005
- 15) Gupta P, et al : Comparative evaluation of pan-fungal real-time PCR, galactomannan and (1-3)- β -D-glucan assay for invasive fungal infection in paediatric cancer patients. *Mycoses* 60 : 234-240, 2017
- 16) Angebault C, et al : Prospective Evaluation of Serum β -Glucan Testing in Patients With Probable or Proven Fungal Diseases. *Open Forum Infect Dis* 3 : ofw128, 2016
- 17) Huppler AR, et al : Role of Molecular Biomarkers in the Diagnosis of Invasive Fungal Diseases in Children. *J Pediatric Infect Dis Soc* 6 (Suppl 1) : S32-S44, 2017
- 18) Karageorgopoulos DE, et al : Accuracy of β -D-glucan for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia : a meta-analysis. *Clin Microbiol Infect* 19 : 39-49, 2013
- 19) Gonzalez BE, et al : Elevated Serum Beta-D-Glucan Levels in Immunocompromised Children with Clinical Suspicion for *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia. *Clin Vaccine Immunol* 18 : 1202-1203, 2011

Test methods and characteristics for invasive pulmonary mycosis in children

Ryu YONEDA¹⁾, Hanako FUNAKOSHI¹⁾, Sho ISHII¹⁾, Kotaro ARAKI¹⁾
Takemi MURAI¹⁾, Kahoru FUKUOKA¹⁾, Yuta AIZAWA¹⁾, Yuho HORIKOSHI¹⁾

1) *Division of Infectious Diseases, Department of Pediatrics, Tokyo Metropolitan Children's Medical Center*

The diagnostic method about invasive pulmonary mycosis is challenging in that little is known about the condition in Japanese children. The aim of this study was to evaluate the methods and characteristics of diagnosis for invasive pulmonary mycosis in children. This study included a total of 15 patients with invasive pulmonary mycosis between March 2010 and March 2017. The pathogens were *Aspergillus* spp (n=10), *Mucor* (n=2), and *Pneumocystis jirovecii* (n=2). Proven invasive fungal diseases (IFD) diagnosed by culture from sterile material were identified in 3 patients. Probable IFDs were identified in 10 patients, and 6 of them were diagnosed by antigen tests. Among those patients with aspergillosis, 3 were diagnosed by culture. However, one of them was negative for the Galactomannan antigen, and two negative for (1→3)-β-D-glucan (BDG). Five patients were diagnosed with the Galactomannan antigen, of which three were negative for BDG. Two patients were diagnosed by polymerase chain reaction (PCR), however, both of them were negative for all fungal biomarkers. BDG over 300pg/mL demonstrated in both patients with *P. jirovecii*, which suggested that BDG is likely to increase considerably in *P. jirovecii* pneumoniae. There were some patients who had negative fungal biomarkers despite the positive result of culture or PCR. Therefore, the diagnosis of IFD should be explored comprehensively with several available tests.

Key words: invasive pulmonary mycosis, invasive fungal infection, galactomannan antigen, (1→3)-β-D-glucan

(受付：2017年11月27日，受理：2018年4月3日)

* * *