

〈原著〉

## 2種の(1→3)-β-D-グルカン測定試薬の 真菌に対する反応性の比較

松林 直、山崎 智之

### Comparison of the reactivity of two kinds of (1→3)-β-D-glucan measurement reagents to fungi

Tadashi Matsubayashi and Tomoyuki Yamazaki

**Summary** Measurements of (1→3)-β-D-glucan are widely used for the diagnosis of deep mycosis, and the amebocyte lysate of a horseshoe crab is used in (1→3)-β-D-glucan reagent. There are two kinds, *Tachypleus tridentatus* and *Limulus polyphemus*, used in horseshoe crabs as the materials of a reagent.

When the patient plasmas were measured with both reagents that were made of a different horseshoe crab lysate, measurement values did not agree in any samples.

Therefore, in order to examine the cause of the discrepancy with both reagents, we compared the reactivity to the fungi released (1→3)-β-D-glucan to 52 strains of 27 species of a deep mycosis.

As a result, we confirmed the difference in the reactivity of both reagents in some fungi. It was suggested that the released (1→3)-β-D-glucan from each fungus was not identically, and also that the reactivities of each lysate to (1→3)-β-D-glucan were not different. Those were considered to be one of the causes of the discrepancy with both reagents.

**Key words:** Deep seated mycosis, (1→3)-β-D-glucan, *Tachypleus tridentatus* amebocyte lysate (TAL), *Limulus polyphemus* amebocyte lysate (LAL)

#### I. 諸言

(1→3)-β-D-グルカンは真菌の表層成分のひとつである。その測定は深在性真菌感染症の補助的診断において重要な検査の一つであり、HIV感染者などに日和見感染症として合併する深在

性真菌感染症の急増に伴い臨床的重要性が高まっている。(1→3)-β-D-グルカンの測定にはカプトガニの血球抽出物（ライセート）が原料として用いられている。これまで当社は中国産カプトガニ由来のライセート（TAL：*Tachypleus tridentatus* amebocyte lysate）を用いたファンギ

日水製薬株式会社製品開発部  
〒307-0036 茨城県結城市北南茂呂1075-2  
受領日 平成24年7月20日  
受理日 平成24年8月2日

Product Development Division,  
Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.  
1075-2 Hokunanmoro, yuki-city, Ibaraki 307-0036, Japan

テックGテストMK (G-MK、製造販売元：生化学工業株式会社) を市場に供給してきたが、中国産カプトガニ原料の入手が困難な状況となり、新たにアメリカ産カプトガニ由来ライセート (LAL: *Limulus polyphemus amoebocyte lysate*) を原料としたファンギテックGテストMK II 「ニッスイ」 (G-MK II、製造販売元：日水製薬株式会社) を開発し、供給を開始した。(承認番号 22400AMX00675000)

新たに開発されたG-MK II の性能は、従来試薬であるG-MKと変わらないものであり<sup>1)</sup>、臨床検体を用いた相関性も回帰式 $y=0.93x+0.34$ 、相関係数 $r=0.943$ と良好であった。しかし、個別の検体についてみると試薬間で測定値が大きく乖離する検体が確認された (Fig. 1)。

(1→3)-β-D-グルカン測定値に関しては測定されるβ-グルカンの形状や分子量の違いが、測定試薬の反応性に違いを示すことが報告されている<sup>2), 3), 4)</sup>。そこでライセートの由来が異なる2つの試薬を用い、感染菌種によるG-MKとG-MK II の測定値の乖離について基礎検討を行い、知見を得たので報告する。

## II. 方法と材料

### 1. 対象

検討には当社が所有する真菌27菌種52株 (*Aspergillus*属 2菌種 2株、*Candida*属 19菌種 43株、*Cryptococcus*属 6菌種 7株) を用いた。凍結保存された各菌株はニッスイプレート羊血液寒天培地 (日水製薬株式会社) で培養 (35℃, 24時間) を行い、試験に使用した。血清での培養には(1→3)-β-D-グルカンが陰性であることを予め確認したウシ胎児血清 (FBS: Fetal Bovine serum, biowest/France) を用いた。

### 2. 実験手順

羊血液寒天培地で培養された各菌株を2 mLの注射用生理食塩水 (大塚製薬株式会社) に懸濁し、McFarland 1相当の菌液を調製した。この菌液を注射用生理食塩水で更に10<sup>3</sup>倍希釈し、3 mLのFBSが分注された滅菌試験管に100 μLを滴下して攪拌し、菌接種血清を調製した。菌接種血清を400 μL採取して遠心し、その上清を培養開始直後の(1→3)-β-D-グルカン測定試料とし

て-40℃で凍結保存した。残りの菌接種血清は37℃で培養し、24時間及び48時間培養後に同様の操作により(1→3)-β-D-グルカン測定試料として凍結保存を行った。

### 3. 測定方法

#### 1) (1→3)-β-D-グルカンの測定

培養時間毎に-40℃で凍結保存された(1→3)-β-D-グルカン試料の測定にはG-MKおよびG-MK II を使用し、添付文書に記載された操作方法に従って測定した。その際、一方の試薬の(1→3)-β-D-グルカン値が500 pg/mLを越える場合には、キットに含まれる蒸留水で測定範囲に入るまで希釈し、その希釈された検体を両試薬で測定した。両試薬の測定原理及び操作法は同じ

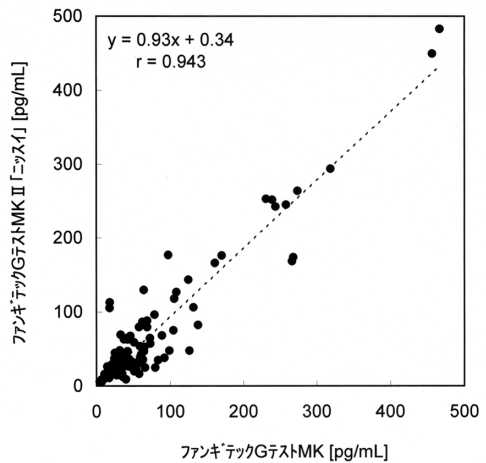


Fig. 1 Correlation between Fungitec G-testMK and Fungitec G-test MK II "Nissui". Refer to Jpn J Med Pharm Sci, 67: 895-902, 2012.

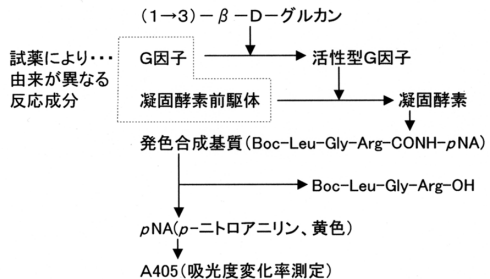


Fig. 2 Principle of measurement.

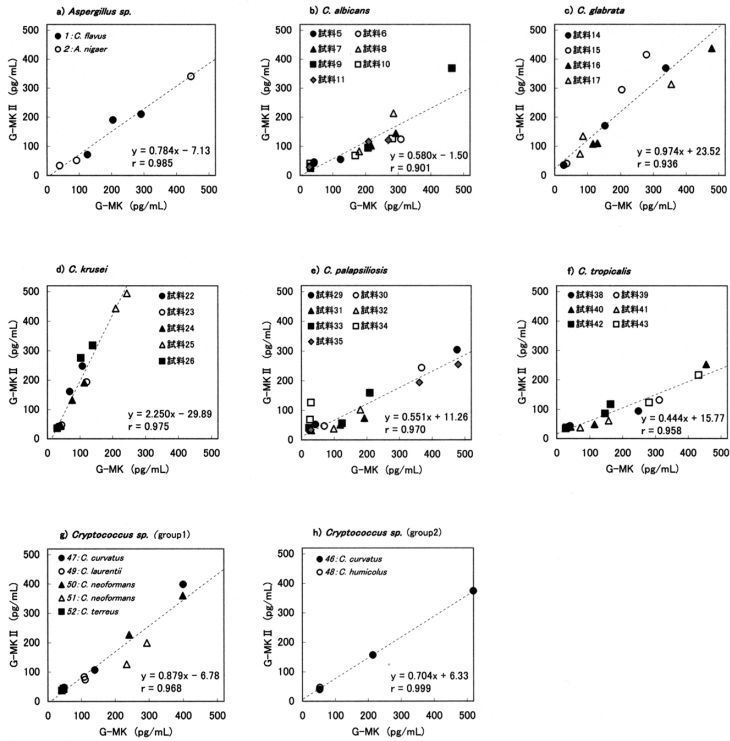


Fig. 3 Comparison of the reactivity to both reagents in various strains.

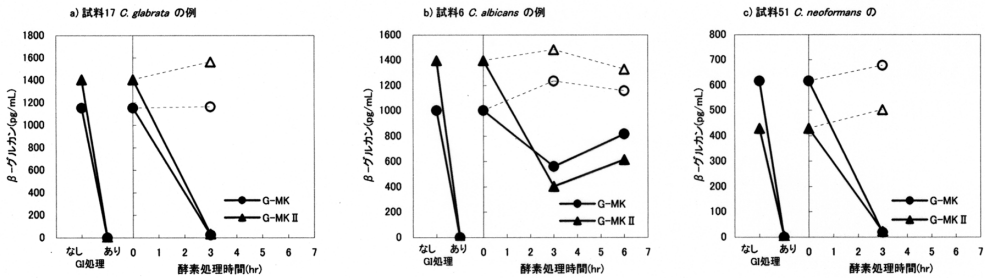


Fig. 4 Denial of the non-specific reaction by addition of glucan inhibitor, and a disappearance of the  $\beta$ -glucan by glucanase treatment (○, △: non-treatment).

であるが、試薬中のG因子および凝固酵素前駆体の由来がG-MKでは中国産カプトガニ、G-MK IIではアメリカ産カプトガニである (Fig. 2)。

測定機器は両試薬ともWellreaderSK603 (生化学工業株式会社) を使用し、Reader for Windows SK603/MP-96 Version 1.80により濃度算出した。

## 2) 非特異反応の否定

菌接種血清で上昇する(1→3)- $\beta$ -D-グルカンの反応が非特異反応によるものではないことを、G因子活性化阻害剤 (GI: Glucan inhibitor) 及び酵素処理により確認した。GIによる確認は laminaran oligosaccharides (生化学工業株式会社)

を主反応液中に10  $\mu$ g/mLとなるように添加し、48時間培養後血清と反応させて吸光度の変化を確認した<sup>5),6)</sup>。酵素処理による確認は、48時間後の培養血清にグルカナゼ（商品名Zymolyase-100T from *Arthrobacter luteus*、ナカライテスク株式会社）を35 U/mLとなるよう添加し、37℃で3時間反応させて(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-グルカン測定値の低下を確認した。

### Ⅲ. 結果

#### 1. 菌種別にみた両試薬との反応性比較

時間ごとに採取した各菌接種血清の(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-グルカン量をTable 1に示した。これらの結果を*Aspergillus*属は一括で、*Candida*属は複数の菌株を測定した菌種毎に、*Cryptococcus*属は傾向の異なる2つのグループに分けて接種直後から培養48時間までの全測定結果をプロットし、回帰式と相関係数を算出した（Fig. 3）。回帰式の傾きはG-MKとG-MK IIとの反応比率を示しており、*Aspergillus*属や*Cryptococcus*属（group1）、*C. glabrata*では両試薬の(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-グルカン測定値がほぼ近似する結果を示した。一方、*C. krusei*はGMK IIでの(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-グルカン測定値が高く、残りの菌種はG-MKでの(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-グルカン測定値が高かった。反応比率は菌種ごとに異なっていたが、同一菌種内における反応性のバラツキは小さかった。

#### 2. 非特異反応の否定

GIの添加によりいずれの試料も反応が阻害されたことから、培養血清の(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-グルカン測定値の上昇には非特異反応の関与はないと考えられた。（Fig. 4）

また、酵素処理により(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-グルカン測定値が低下したことから、各菌種における測定値の上昇は菌体由来の(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-グルカンによることが示唆された。但し、一部の試料については(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-グルカンの反応が完全に消失しないものも見られた（Fig. 4b）。これらの検体は37℃で6時間反応させても測定値は低下せず、酵素量の増加や検体の希釈についても追加検討したが、(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-グルカンの反応は完全に消失しなかった。（結果非表示）

### Ⅳ. 考察

今回行った菌の血清培養による検討の結果から、ライセートの由来が異なるG-MKとG-MK IIの2試薬の反応性は、接種した菌種によって異なることが確認された。また、その反応性の傾向はTALに強く反応するもの、逆に、LALに強く反応するものなど多様であり、これらの違いが臨床検体の相関に見られた2試薬間の測定値乖離の原因の1つになっていると考えられる。

菌種による反応性が異なる要因としては、①測定試料は遠心されており菌体自体の影響はなく、②培養から検出までの条件は共通でFBSや実験操作の影響もなく、③非特異反応も否定されていることから菌種毎に構造の異なる(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-グルカンが放出されていると考えられるが、さらに2試薬間で菌種による反応性が一致しない点を加味すると、(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-グルカンに対するライセート成分の反応性も、カプトガニの種により異なることが考えられる。ライセート成分のうち影響の大きな要因はG因子と考えられる<sup>7),8)</sup>が、菌種により放出される $\beta$ -グルカンの違いと種によるG因子の違いの組み合わせにより、両試薬の測定値の乖離はFig. 5の様な機序で生じているものと我々は推測している。

一部の菌種の培養血清が酵素処理を行っても(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-グルカンの反応が完全に消失できなかった点については、放出されたものが酵素で消化されない1 $\rightarrow$ 4や1 $\rightarrow$ 6結合などを含む(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-グルカンであると推察された。また、同じ菌種の中では、異なる菌株の測定結果をプロットしても0.9を超える高い相関係数が得られていることから、同じ菌種からは同質の(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-グルカンが放出されている可能性が高い。

今回の検討では*Cryptococcus*属の5菌株に(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-グルカンの上昇が確認された（Fig. 6）。一般的な認識として原発性肺クリプトコッカス症では(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-グルカンの上昇は認められない<sup>9),10)</sup>とされているが、上昇するケースも報告されている<sup>11)</sup>。今回の結果は臓器を介して(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-グルカンが放出される生体内の状況と異なり、血清中での菌の増殖であるため(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-グルカンが上昇したと推察する。

今回の検討に先立ち、我々は相関で乖離した臨床検体について検体からの菌の培養を試みた

Table 1 Fluctuation of the  $\beta$ -glucan value for each cultivation time in various strains

試料 No.	菌株 (番号)	培養時間 (hr)	希釈倍率	$\beta$ -グルカン測定値 (pg/mL)	
				GテストMK	GテストMK II
<b>Aspergillus 属</b>					
1	<i>A. flavus</i> (NS 6343)	0	1	126	71
		24	100	29175	20990
		48	100	20525	18980
2	<i>A. niger</i> (IFO 9455)	0	1	39	34
		24	100	9195	5170
		48	100	44535	34030
<b>Candida 属</b>					
3	<i>C. albicans</i> (TIMM3169)	0	1	43	45
		24	100	12385	5515
		48	100	42	42
4	<i>C. albicans</i> (TIMM3170)	0	1	32	25
		24	100	30865	12370
		48	1000	293150	144100
5	<i>C. albicans</i> (JCM 2070)	0	1	32	25
		24	1000	217350	101900
		48	1000	32	32
6	<i>C. albicans</i> (JCM 2071)	0	1	286	213
		24	100	18105	8270
		48	100	32	31
7	<i>C. albicans</i> (JCM 2072)	0	1	465	368
		24	100	20845	9505
		48	100	31	40
8	<i>C. albicans</i> (JCM 2074)	0	1	16915	6855
		24	100	28290	12605
		48	100	29	28
9	<i>C. albicans</i> (JCM 2078)	0	1	2098	1156
		24	100	26995	12105
		48	100	54	37
10	<i>C. boidinii</i> (NBRC 10871)	0	1	66	38
		24	100	71	70
		48	100	54	33
11	<i>C. catenulata</i> (NBRC 745)	0	1	2628	1182
		24	100	28070	10330
		48	100	48	24
12	<i>C. dubliniensis</i> (ATTC MYA-646)	0	1	1809	1344
		24	100	8910	8210
		48	100	32	38
13	<i>C. famata</i> (NBRC 623)	0	1	46	44
		24	100	51	49
		48	100	27	35
14	<i>C. glabrata</i> (TIMM 3171)	0	1	3380	3688
		24	100	15250	16995
		48	100	37	40
15	<i>C. glabrata</i> (JCM 3699)	0	1	204	295
		24	100	279	415
		48	1000	130	110
16	<i>C. glabrata</i> (JCM 3761)	0	1	47805	43750
		24	1000	116150	107950
		48	1000	86	135
17	<i>C. glabrata</i> (MBL 0737P)	0	1	35440	31380
		24	1000	77150	74000
		48	100	32	38
18	<i>C. guilliermondii</i> (MBL 0738P)	0	1	271	168
		24	100	342	235
		48	100	30	38
19	<i>C. inconspicua</i> (NBRC 621)	0	1	436	337
		24	100	1986	1500
		48	100	40	49
20	<i>C. intermedia</i> (NBRC 761)	0	1	64	62
		24	100	74	71
		48	100	31	41
21	<i>C. kefyr</i> (MBL 0990P)	0	1	139	115
		24	100	174	165
		48	100	34	42
22	<i>C. krusei</i> (JCM 1608)	0	1	68	161
		24	100	108	248
		48	100	44	46
23	<i>C. krusei</i> (JCM 1609)	0	1	121	194
		24	100	42	44
		48	100	762	1324
24	<i>C. krusei</i> (JCM 1712)	0	1	1133	1919
		24	100	40	43
		48	100	210	443
25	<i>C. krusei</i> (JCM 2283)	0	1	244	494
		24	100	30	36
		48	100	103	276
26	<i>C. krusei</i> (JCM 2344)	0	1	139	318
		24	100	38	80
		48	100	143	177
<b>Cryptococcus 属</b>					
46	<i>C. curvatus</i> (NBRC 1159)	0	1	53	40
		24	100	214	157
		48	200	1038	749
47	<i>C. gattii</i> (NS 11232)	0	1	43	41
		24	100	401	398
		48	100	1395	1070
48	<i>C. humicola</i> (NBRC 760)	0	1	53	47
		24	200	11077	4228
		48	200	121790	40900
49	<i>C. laurentii</i> (MBL 0333P)	0	1	48	48
		24	100	111	74
		48	100	109	83
50	<i>C. neoformans</i> (TIMM 3173)	0	1	47	42
		24	100	242	227
		48	100	399	360
51	<i>C. neoformans</i> (TIMM 3174)	0	1	41	40
		24	100	294	199
		48	100	2341	1267
52	<i>C. terreus</i> (NBRC 727)	0	1	42	37
		24	100	46	42
		48	100	48	44

注) NSは自社分離菌株

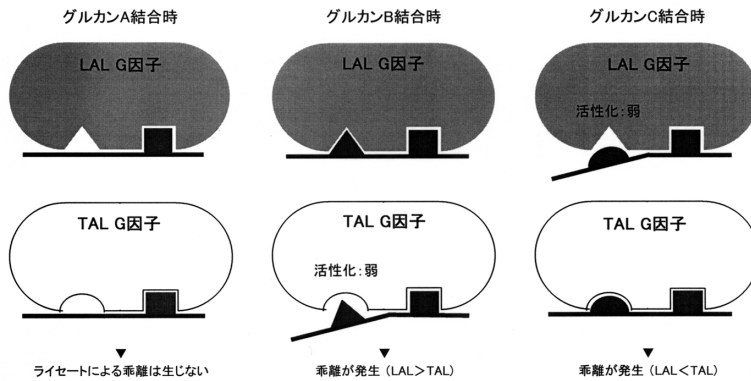


Fig. 5 Imaginary picture of the mechanism of discrepant reaction by assortment of the released  $\beta$ -glucan and the horseshoe crab lysate.

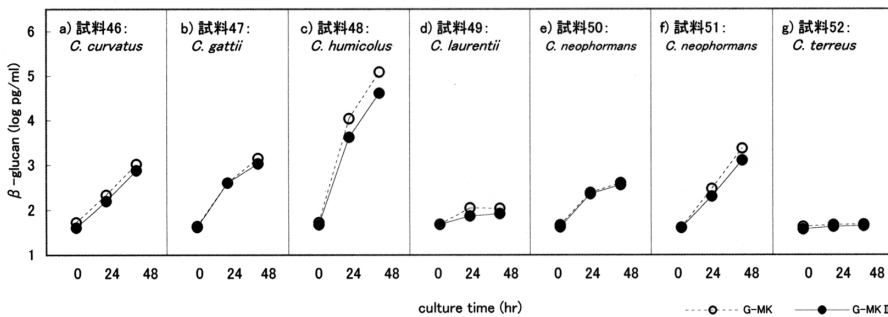


Fig. 6 Increase of the  $\beta$ -glucan value of *Cryptococcus sp* by FBS cultivation.

が、菌の発育は認められず起病菌の特定に至らなかった。過去の文献<sup>11)</sup>に於いても臨床検体からの起病菌の検出率は低く、さらに患者の臨床的背景の考慮も必要なため、測定値乖離の原因究明を臨床検体から行うことは非常に難しいと考えられる。また深在性真菌症患者の血液中に存在する抗体<sup>12), 13)</sup>によって乖離が生じている可能性も考えられるが、今回検討を行った菌種の違いが乖離の主な原因であると推測された。

## V. 結語

27菌種52株の真菌を接種して培養したFBSをG-MKとG-MK IIの2試薬で測定したところ、試薬間の測定値の乖離傾向が菌種により異なるこ

とが確認された。この結果は臨床検体における測定値乖離の一因として考えられ、菌種毎に放出される(1→3)- $\beta$ -D-グルカンが同一ではないことと、カプトガニの種によるライセートの反応性の違いが関与しているものと推察された。

## 謝辞

本論文の作成にあたり、懇切丁寧なるご指導を賜りました近畿大学医学部附属病院安全管理部感染対策室教授 吉田 耕一郎先生に心より感謝申し上げます。

## 文献

- 1) 吉田耕一郎, 二木芳人, 松林 直, 山崎智之: アメリカ産カプトガニ原料を用いた(1→3)- $\beta$ -D-グル

- カン測定試薬ファンギテックGテストMK「ニッスイ」の基礎的評価. 医学と薬学, 67: 895-902, 2012.
- 2) 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. 防菌防黴, 27: 413-419, 1995.
  - 3) 土谷正和: β-グルカンとリムルス試薬の反応性. 和光純薬時報, 67: 20, 1999.
  - 4) Zekaver Odabasi, et al.: β-D-Glucan as a Diagnostic Adjunct for Invasive Fungal Infections: Validation, Cutoff Development, and Performance in Patients with Acute Myelogenous Leukemia and Myelodysplastic Syndrome, *Clinical Infection Diseases*, 39: 199-205, 2004.
  - 5) 吉田耕一郎, 二木芳人, 松田淳一, 平湯洋一, 小田俊男, 明田川純, 大林民典, 河野 茂, 岡三喜男: 改良アルカリ前処理法を用いた血中(1→3)-β-D-グルカン測定法の基礎的検討. 感染症学雑誌, 79: 433-442, 2005.
  - 6) Tanaka S, Aketagawa J, Takahashi S, Sibata Y, Tsumuraya Y, Hashimoto Y: Inhibition of highmolecular-weight-(1-3)-β-D-glucan-dependent activation of a limulus coagulation factor G by laminaran oligosaccharides and curdlan degradation products. *Carbohydr Res*, 244: 115-27, 1993.
  - 7) Tatsushi Muta, Noriaki Seki, Yoshie Takaki, Ryuji Hashimoto, Toshio Oda, Atsufumi Iwanaga, Fuminori Tokunaga, and Sadaaki Iwanaga: Purified Horseshoe Crab Factor G Reconstitution and characterization of the (1→3)-β-D-glucan-sensitive serine protease cascade. *J Biol Chem*, 270: 892-897, 1995.
  - 8) 柴田俊生, 川畑俊一郎: カプトガニの病原体に対する自然免疫の応答と制御. 化学と生物, 50: 227-282, 2012.
  - 9) 大林民典: (1→3)-β-D-グルカン定量による深在性真菌症のスクリーニング. 臨床病理, 44: 528-532, 1996.
  - 10) 茂呂 寛, 塚田弘樹, 小原竜軌, 諏佐理津子, 田邊嘉也, 鈴木栄一, 下条文武: 臨床検体を用いた血中(1→3)-β-D-グルカン測定キット4種類の比較検討. 感染症学雑誌, 77: 227-234, 2003.
  - 11) Taminori Obayashi, Kumiko Negishi, Tomokazu Suzuki and Nobuaki Funata: Reappraisal of the Serum (1→3)-β-D-Glucan Assay for the Diagnosis of Invasive Fungal Infections - A Study Based on Autopsy Case from 6 Years. *CID*, 46: 1864-1870, 2008.
  - 12) Ken-ichi Ishibashi, Masaharu Yoshida, Iwao Nakabayashi, Hroyasu Shinohara, Noriko N. Miura, Yoshiyuki Adachi, Naohito Ohno: Role of anti-β-d-glucan antibody in host defense against fungi. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 44: 99-105, 2005.
  - 13) Masaharu Yoshida, Ken-ichi Ishibashi, Shunsuke Hida, Noriko Yoshikawa, Iwao Nakabayashi, Masakazu Akashi, Taeko Watanabe, Tomohiro Tomiyasu, Naohito Ohno: Rapid decrease of anti-β-D-glucan antibody as an indicator for early diagnosis of carinii pneumonitis and deep mycotic infections following immunosuppressive therapy in anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Clin Rheumatol*, 28: 565-571, 2009.