

新規に保険収載された検査法 抗トリコスポロン・アサヒ抗体

Anti-*Trichosporon asahii* antibody detection kit

みや ざき やす なり いな せ なお ひこ
宮 崎 泰 成 : 稲 瀬 直 彦
Yasunari MIYAZAKI Naohiko INASE

はじめに

トリコスポロン・アサヒは、雨漏りや浴室の湿気で腐った木や湿気を含んだ畳などに発生する真菌である。この真菌は、夏型過敏性肺炎というアレルギー性の間質性肺炎の原因抗原となる。過敏性肺炎の診断において最も重要なのは原因抗原を特定することである。原因抗原が特定できれば原因を除去可能となり改善が期待できる。そのため血清診断によって原因抗原が診断可能な特異抗体測定試薬（または検出試薬）の開発が待望されていた。抗トリコスポロン・アサヒ抗体測定キットは、この夏型過敏性肺炎を診断するために熊本大学、東京医科歯科大学およびシノテスト社によって共同開発された。本診断法は、夏型過敏性肺炎の鑑別診断を目的とした検査法であり、2013年6月1日より保険収載（900点）された。そこで、本稿では夏型過敏性肺炎とは何であるか、トリコスポロン・アサヒの抗原部位、そして本検査法の測定意義について概説する。

I. 症例

本疾患を理解するために典型的な症例を提示する。（下線部はこの疾患に特徴的な症状や検査結果など）

63歳女性の主婦。ある年の8月に乾性咳嗽を主訴にかかりつけの近医を受診した。感冒と診断されて投薬を受けたがあまり改善はなく、経過を見ているうちに乾性咳嗽は冬にかけて自然に改善していた。翌年の6月再び咳嗽と労作時呼吸困難が出現、1カ月経過を見ても改善がないため当院を受診入院。

- 生活社会歴：喫煙歴なし、家；木造築40年、日当たり不良、湿気多い、家の前に川が流れている。台所のタイルにカビあり、風呂場の入り口の床に腐木あり、カビあり。寝室の天井に雨漏りあり、カビあり。加湿器使用なし。ベランダに鳥の飛来あり。鳥飼育歴なし。羽毛布団使用歴なし。
- 身体所見：体温36.1度、両下胸部で fine crackles を聴取。
- 検査所見：軽度のCRP上昇とKL-6上昇（KL-6, 1882U/ml）、肺機能検査では拡散障害（%DLco, 53%）と低酸素血症（PaO₂, 65mmHg in room air）を認めた。
- 胸部X線写真正面像：全肺野にすりガラス状陰影を認める（図1）。
- 胸部CT：両肺野に小葉中心性の淡く辺縁が不明瞭な粒状影を認める。汎小葉性のすりガラス状陰影を認め、モザイクパターンを呈する部分もある（図2）。



図1 急性夏型過敏性肺炎の胸部レントゲン写真正面像

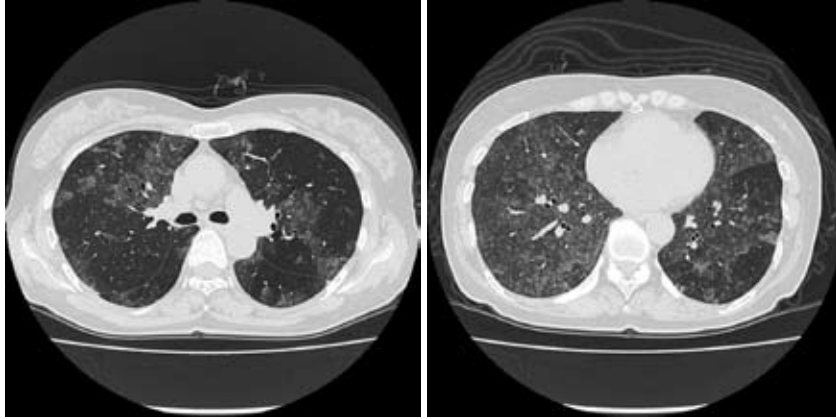


図2 急性夏型過敏性肺炎の胸部CT

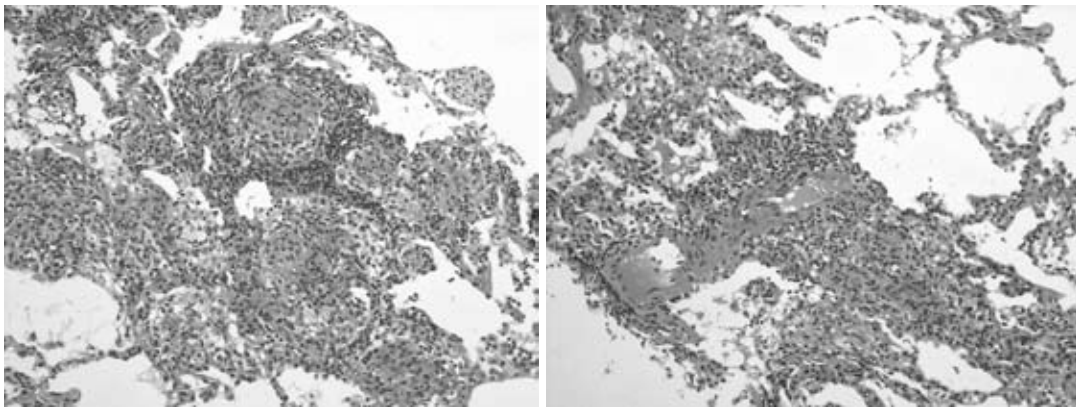


図3 急性夏型過敏性肺炎の病理(日赤医療センター 武村民子先生より提供)

入院後の経過

画像より急性夏型過敏性肺炎を疑い、原因があると考えられる自宅環境から離れる目的で入院継続し抗原回避を開始した。気管支鏡検査を施行した。

- 気管支肺胞洗浄液 (Bronchoalveolar lavage fluid : BALF) においてリンパ球分画 61% と増加、CD4/CD8 比 0.57 と低下し、経気管支肺生検では肺胞道に粗な肉芽腫、肺胞領域ではリンパ球性胞隔炎を認め(図3) 無治療にて症状、聴診所見、検査所見(動脈血液ガス所見、6分間歩行、肺機能検査) および画像の改善を認めた。
- 検査に提出していた抗トリコスポロン・アサヒ抗体が強陽性(血清および気管支肺胞洗浄)であったため、急性夏型過敏性肺炎と診断した。
- 環境調査で居住環境が原因と判明したため、転居を指導し退院となった。

この症例は急性夏型過敏性肺炎の典型例である。抗トリコスポロン・アサヒ抗体の測定結果が診断において重要であることが分かる。

Ⅱ. 夏型過敏性肺炎とは — 梅雨に繁殖するトリコスポロン・アサヒが原因の間質性肺炎 —

過敏性肺炎は、さまざまな環境中抗原を吸入した際に肺局所で免疫反応が起こり発症する疾病である¹⁾。夏型過敏性肺炎はすべての過敏性肺炎の中で74%を占め、日本では過敏性肺炎の中で最も頻度の高い疾患となっている²⁾。その他、過敏性肺炎には農夫肺、鳥関連過敏性肺炎、加湿器肺が含まれる。夏型過敏性肺炎は日本特有の過敏性肺炎として1973年に初めて報告された。この臨床的な特徴は、以下の3つであった。①患者が自宅にいるときに症状が起こる。②夏に発症し、中秋には自然軽快する。③家族内で発症する³⁾。この臨床的特徴を持つ患者群の血清中クリプトコッカス・ネオフォルマンズ抗体を測定したところすべての患者において陽性であったため、当初、この真菌が原因と考えられた⁴⁾。

しかし、本疾患の患者において、細菌学的調査により自宅でトリコスポロンの存在が証明されたこと⁵⁾、トリコスポロンに対して高い抗体価を持っていたこと⁶⁾、トリコスポロンの培養濾液による吸入誘発試験が陽性であったこと⁷⁾、BALF中にトリコスポロンDNAの存在が証明されたことより^{8,9)}、分節孢子形成性酵母様真菌であるトリコスポロン・アサヒ(図4)やトリコスポロン・ムコイデスが抗原真菌であることが安藤らのグループにより証明された。

●疫学：

2回にわたる全国調査の結果より過敏性肺炎の中での夏型過敏性肺炎の頻度は69.8% (n=624) から74.4% (n=621) と考えられる^{2,3)}。発症率は不明であるが、年間およそ400～500人以上は発症していると考えられている。女性の発症率は男性の2倍で、多くの患者が専業主婦であった。5月から10月に発症し、7月にピークを認め、11月には自然に症状が軽快する。夏期に再発する症例は全体の38%に認められ、家族内発症は23.8%に認める²⁾。

地理的な分布をみると、患者の発症地域は沖縄県から北緯40度の秋田県、岩手県間で広がっている(図5)。しかし、北海道、青森県や岩手県での報告はなく、これらの地域では気候が寒冷で乾燥しているためだと考えられる。日本以外では、韓国において数例の症例報告がある¹⁰⁾。このような発症分布を示すのは、トリコスポロンが25～28度、湿度80%の環境では非常に急速に繁殖し、湿った木や植物に繁殖しやすいためである。したがって、本疾患は、梅雨の時期で、築20年以上の古い木造家屋において発症しやすい²⁾。

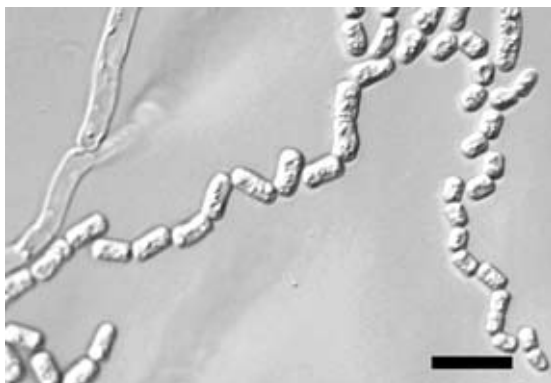


図4 トリコスポロン・アサヒの分生子
(明治薬科大学微生物学教室 杉田隆先生より提供)

●臨床像：

夏型過敏性肺炎の原因真菌であるトリコスポロン(図4)は木造家屋の雨漏りで腐った天井、風呂場の木の窓枠や脱衣所の床が腐った場所に増殖する。そのため、夏季に咳嗽、喀痰、発熱、呼吸困難などで発症し、冬季に消失するのが一般的であるが、初回発症時は10～12月に症状がでることは稀ではない¹¹⁾。一度感作されると年々発症時期が早くなる傾向がある。症状は抗原曝露後数時間から数週の間に出現し、咳嗽および労作時呼吸困難はほぼ全例で認められる。発熱も37から39度と比較的高い²⁾。慢性では、症状は数カ月にわたって出現し、咳嗽や労作時呼吸困難の頻度が高くなり、発熱はあっても微熱程度である。喀痰の出現頻度は、両者とも比較的低く30～40%程度である¹²⁾。

●診断基準(表1)：

急性過敏性肺炎の診断基準を表1に示す。抗トリコスポロン抗体の重要性が分かる。

➤検査所見、免疫学的所見：

KL-6, SP-Dは急性では著明に上昇し、慢性では中程度の上昇にとどまる。肺機能検査では、両者とも拘束性換気障害を認めるが、慢性では特に労作時の低酸素血症を呈する。6分間歩行は診断や治療経過の際にチェックする。原因真菌を推定

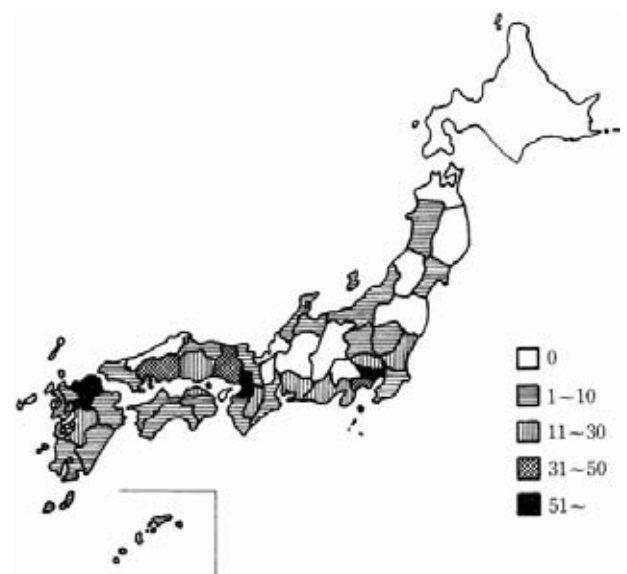


図5 SHP621症例の地理的分布
(文献3より引用)

表1 急性過敏性肺炎の診断基準（文献11より引用）

A. 臨床像	臨床症状・所見1)～4)のうちいずれか2つ以上と、検査所見1)～4)のうち1)を含む2つ以上の両者を同時に満足するもの
1. 臨床症状・所見	1)咳、2)呼吸困難、3)発熱、4)捻髪音ないし小水泡性ラ音
2. 検査所見	1)胸部X線像にてびまん性散布性粒状影(またはスリガラス状陰影) 2)拘束性換気機能障害 3)血沈値亢進、好中球増多、CRP陽性のいずれか1つ 4)低酸素血症(安静時あるいは運動後)
B. 発症環境	1)～6)のうちいずれか1つを満足するもの 1)夏型過敏性肺炎は夏期(5-9月)に、高温多湿の住宅で起こる 2)鳥関連過敏性肺炎は鳥の飼育や羽毛と関連して起こる 3)農夫肺はかびた枯れ草の取り扱いと関連して起こる 4)空調病、加湿器肺はこれらの機器の使用と関連して起こる 5)有機塵埃抗原に曝露される環境での生活歴 6)特定の化学物質と関連して起こる 註：症状は抗原曝露4-8時間で起こることが多く、環境から離れると自然に軽快する。
C. 免疫学的所見	1)～3)のうちいずれか1つを満足するもの 1)抗原に対する特異抗体陽性(血清あるいはBALF中) 2)特異抗原によるリンパ球幼弱化試験(末梢血あるいはBALリンパ球) 3)BAL所見(リンパ球増加、Tリンパ球増加)*
D. 吸入誘発	1)～2)のうちいずれか1つを満足するもの 1)特異抗原吸入による臨床像の再現 2)環境曝露による臨床像の再現
E. 病理学的所見	1)～3)のうちいずれか2つ以上を満足するもの 1)肉芽腫形成、2)胞隔炎、3)Masson体
【診断基準】	確実：A, B, DまたはA, B, C, Eを満たす 強い疑い：Aを含む3項目を満たす 疑い：Aを含む2項目を満たす

*：一般的にリンパ球比率は35%を超える。抗原回避2日以内では好中球増多を示す。

するために、サブロー培地を用いた室内落下菌の培養が行われる。本邦で最も原因として頻度の高いトリコスポロン・アサヒは、ELISAにて抗体価を測定することが可能である（本検査が保険収載された）。

➤画像：

胸部X線では、中下肺野中心にすりガラス影を認めるが異常所見を認めないこともある。胸部CTでは、小葉中心性の粒状影あるいは辺縁不明瞭な小結節、さらに汎小葉性のすりガラス影を呈する。モザイク分布になることもある。これらのすりガラス影は濃淡があり、浸潤影となることもある（図1, 2）。鑑別としては、RB-ILD、ニューモシスチス肺炎、粟粒結核、サルコイドーシス、じん肺症であるが、病変の性状や分布に注意して読影すると間違えることは少ない。

➤病理：

リンパ球性胞隔炎を細気管支領域に認める。中心壊死を伴わない類上皮細胞肉芽腫は150 μ m以下の大きさで、細胞密度が粗である。これらの肉芽腫は細気管支壁や肺胞道に存在する（図3）。

●治療

基本は抗原回避である。夏型過敏性肺炎では改築を含めた環境改善が必要である。特に風呂場や台所に注意し、トリコスポロンが繁殖しやすい腐木、寝具、畳、カーペットを処分する。転居も考慮する。急性の中等症以上では、プレドニゾロン20-30mg/日、重症例ではプレドニゾロン40-60mg/日内服する。慢性では、免疫抑制薬を併用することもある。

Ⅲ. 抗トリコスポロン・アサヒ抗体の測定原理 - エピトープの発見 -

●原因真菌

最初にトリコスポロンが抗原として特定されたときは、原因真菌はトリコスポロン・クタネウムであると考えられていた。この真菌は血清型によりI～Ⅲ型の3つに分類された¹³⁾。その後、遺伝学的手法に伴い、GuehoらがrRNAの塩基配列によってトリコスポロン属の分類を見直した結果、トリコスポ

ロン・クタネウムは10以上に再分類された¹⁴⁾。夏型過敏性肺炎に関する原因真菌を杉田らが最新のトリコスポロン分類を用いて行った。36名の夏型過敏性肺炎患者宅で菌の同定をしたところ、105株同定され、血清型Ⅰが43株(41.1%)、血清型Ⅱが53株(50.5%)、血清型Ⅲが9株(8.6%)であった。この血清型Ⅰの43株のうち42株(97.7%)はトリコスポロン・デルマトリス(以前のムコイデス)と同定され、血清型Ⅱの53株のうち37株(69.8%)はトリコスポロン・アサヒで8株(15.1%)がトリコスポロン・ジャポニカムであり、血清型Ⅲの9株のうち7株(77.8%)は、トリコスポロン・モンテビデンスであった¹⁵⁾。つまり、夏型過敏性肺炎の原因真菌として、トリコスポロン・デルマトリス、トリコスポロン・アサヒ(ジェノタイプ3)、トリコスポロン・モンテビデンスが重要で、それぞれ血清型Ⅰ、Ⅱ、Ⅲを代表することが分かった¹⁵⁾。

●原因抗原：

溝部らによりトリコスポロン・アサヒの培養濾液より原因抗原物質が抽出された。彼らは、まず菌血清型Ⅱに特異的であり、かつクリプトコッカス・ネオフォルマンズとの交差反応のないモノクローナル抗体を作製した(抗D-8抗体)¹⁶⁾。抗トリコスポロン・アサヒ抗体D-8結合ゲルを用いたアフィニティー精製抗原を解析した。この物質は分子量約80万の物質であると推定され、組成分析では、タンパク質は検出されず、マンノース、キシロース、グルクロン酸によって構成される高分子多糖体が原因抗原であることが分かった(図6)^{17,18)}。この抗原を使用してトリコスポロン・アサヒ抗体検出キットが熊本大

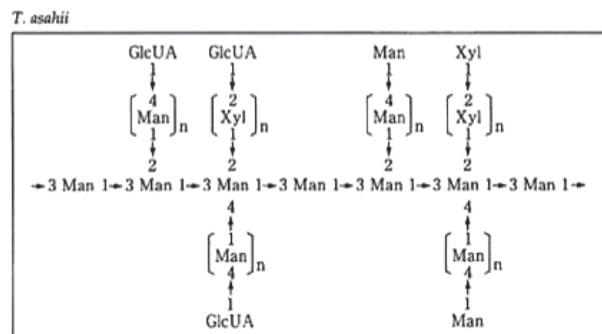


図6 トリコスポロン・アサヒの多糖体抗原の構造
(文献17より引用)

学、東京医科歯科大学とシノテスト社により共同で開発された¹⁹⁾。

Ⅳ. 抗トリコスポロン・アサヒ抗体の測定意義

本検査は、Antigen-captured ELISA法である。交差反応のないモノクローナル抗体(抗D-8抗体)を使用したため、類似菌種であるクリプトコッカス・ネオフォルマンズやトリコスポロン・ムコイデスに対する交叉反応を抑え、抗トリコスポロン・アサヒ抗体への特異性が高い。しかし、約800kDのD-8抗原は親水性が高く、マイクロプレートなどの担体に直接結合させることが難しかったため、先にモノクローナル抗体D-8をプレートに結合させる方法が考案された。さらに市販のキットでは、これをさらに進め、抗原の高分子量分画を用い、酵素反応の発色感度を最適化することで、感度と特異性を改善している(図7)¹⁶⁾。

●測定方法および解析方法²⁰⁾：

試薬

- ①抗原結合プレート(測定ウェルと対照ウェルよりなる。測定ウェルはモノクローナル抗体D-8を介してトリコスポロン・アサヒ特異抗原が結合したもの、対照ウェルはD-8のみが結合しているものである。測定はこれらを一対として操作する。)
- ②検体希釈液
- ③陽性コントロール(陽性患者の血清)
- ④酵素標識抗体(POD標識抗ヒトIgG抗体)
- ⑤発色液(4-aminoantipyrine, phenol + H₂O₂)
- ⑥反応停止液(8M塩酸グアニジン)

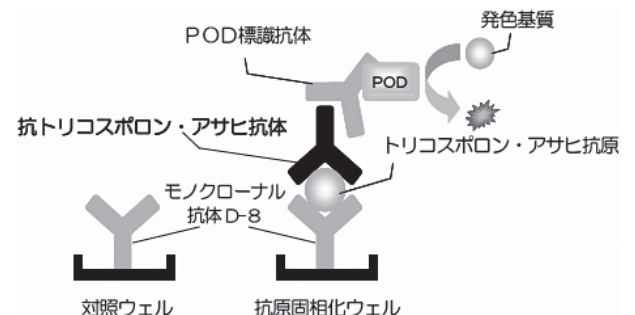


図7 抗トリコスポロン・アサヒ抗体の測定原理
(Antigen-captured ELISA法)

(シノテスト社パンフレットより引用)

●測定手順

1. 検体を検体希釈液で 100 倍に希釈し、陽性コントロールとともに抗原結合プレートに 100 μ l ずつ添加。
2. 37 $^{\circ}$ C にて一夜反応させた後洗浄し、酵素標識抗体 100 μ l を添加。
3. 37 $^{\circ}$ C にて 2 時間反応させた後再び洗浄して、発色液 150 μ l を添加。
4. 37 $^{\circ}$ C にて 1 時間反応の後、反応停止液 150 μ l を添加して、吸光度（主波長 490nm、副波長 640nm）を測定。
5. 得られた検体および陽性コントロールの吸光度（ Δ ABS：測定ウェルの吸光度と対照ウェルの吸光度の差）より、各検体の補正吸光度（corrected absorbance index, CAI）を算出。

補正吸光度の算出方法は、以下の通り。CAI 補正係数 = (陽性コントロールの CAI 表示値) / (陽性コントロールの Δ ABS)、検体の CAI = (検体の Δ ABS) \times (CAI 補正係数)、発色が強すぎて吸光度が測定不能となった場合には、吸光度 3 として計算処理した。

以上の測定法解析法にて、臨床例を用いて本キットのカットオフ値を設定し、臨床的有用性を検討した（図 8）。

●臨床検体での検討

193 例の夏型過敏性肺炎と 127 例の健常者を対象とした研究では、カットオフを 0.15 とした場合の感

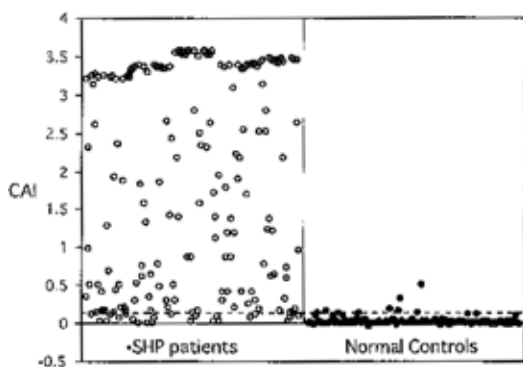
度は 87%、特異度は 96% であった²⁰⁾。65 例の夏型過敏性肺炎、118 例の他の呼吸器疾患、34 例の健常者を対象とした研究では、カットオフを 0.15 とした場合の感度は 92.3%、特異度は 90.1% であった²¹⁾。対象者が別の臨床研究においてほぼ同程度の感度・特異度が得られており、信頼性があると考えられる。

V. 今後の課題

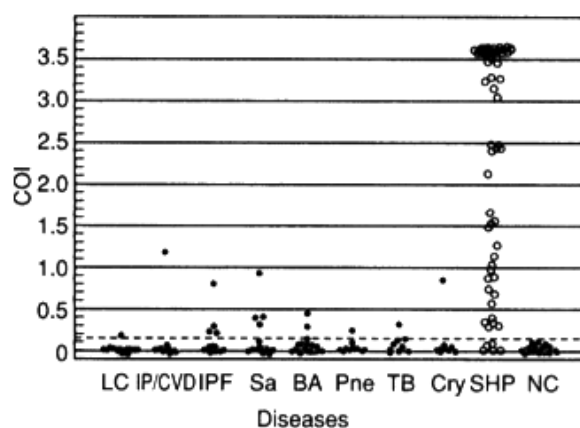
抗トリコスポロン・アサヒ抗体測定は、夏型過敏性肺炎の診断において感度、特異度ともに高く、有用な診断薬と考える。しかし、原因真菌の項で述べたように夏型過敏性肺炎の原因としてトリコスポロン・アサヒ以外に、頻度は低いが、デルマトイスやモンテビデンスなどの血清型 I や III の真菌が存在する。D-8 抗体はデルマトイスとは交差反応を示さないことが確かめられているので、今後これらのトリコスポロンに対する抗体測定キットの開発が望まれる。

おわりに

過敏性肺炎は免疫機序を介した疾患であるため、診断に特異抗体測定は重要である。本測定キットのように感度・特異度の高い検査法が開発されれば、比較的侵襲が少なく迅速な診断が可能である。過敏性肺炎において、トリコスポロンによるもの以外にも、鳥関連抗原による過敏性肺炎も頻度が高い。こ



夏型過敏性肺炎(SHP patients)と健常者(normal controls)の血清抗体価の比較
(文献 20 より引用)



夏型過敏性肺炎(SHP patients)と他疾患の血清抗体価の比較
(文献 21 より引用)

図 8 抗トリコスポロン・アサヒ抗体の測定意義

の抗原に対する特異抗体の測定キットも既に開発されている。臨床での有用性が検討されており、その結果が待たれる。

文 献

- 1) Yoshizawa Y, Inase N, Miyake S, Usui Y, Hamaoka A. Summer-type hypersensitivity pneumonitis -The most prevalent type in Japan. *Research Signpost* ; 2005.
- 2) Ando M, Arima K, Yoneda R, Tamura M. Japanese summer-type hypersensitivity pneumonitis. Geographic distribution, home environment, and clinical characteristics of 621 cases. *Am Rev Respir Dis.* **144** : 765-769, 1991.
- 3) Ando M, Suga M, Nishiura Y, Miyajima M. Summer-type hypersensitivity pneumonitis. *Intern Med.* **34** : 707-712, 1995.
- 4) Miyagawa T, Ochi T, Takahashi H. Hypersensitivity pneumonitis with antibodies to *Cryptococcus neoformans*. *Clin Allergy.* **8** : 501-509, 1978.
- 5) Yoshida K, Ando M, Sakata T, Araki S. Environmental mycological studies on the causative agent of summer-type hypersensitivity pneumonitis. *J Allergy Clin Immunol.* **81** : 475-483, 1988.
- 6) Soda K, Ando M, Shimazu K, Sakata T, Yoshida K, Araki S. Different classes of antibody activities to *Trichosporon cutaneum* antigen in summer-type hypersensitivity pneumonitis by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am Rev Respir Dis.* **133** : 83-87, 1986.
- 7) Ando M, Sakata T, Yoshida K, Yamasaki H, Araki S, Onoue K, Shinoda T. Serotype-related antigen of *Trichosporon cutaneum* in the induction of summer-type hypersensitivity pneumonitis : correlation between serotype of inhalation challenge-positive antigen and that of the isolates from patients' homes. *J Allergy Clin Immunol.* **85** : 36-44, 1990.
- 8) Nakagawa K, Nishiura Y, Cho I, Suga M, Miyajima M, Ando M. Detection of *Trichosporon* in host and environment by polymerase chain reaction (PCR): a new diagnostic approach to hypersensitivity pneumonitis or infection. *Elsevier Science B. V.*; 1998.
- 9) Unoura K, Miyazaki Y, Sumi Y, Tamaoka M, Sugita T, Inase N. Identification of fungal DNA in BALF from patients with home-related hypersensitivity pneumonitis. *Respir Med.* **105** : 1696-1703, 2011.
- 10) Yoo CG, Kim YW, Han SK, Nakagawa K, Suga M, Nishiura Y, Ando M, Shim YS. Summer-type hypersensitivity pneumonitis outside Japan : a case report and the state of the art. *Respirology.* **2** : 75-77, 1997.
- 11) Miyazaki Y, Yoshizawa Y, Yamaguchi T. Summer-type Hypersensitivity Pneumonitis. Jaypee Brothers Medical Publishers ; 2013.
- 12) Yoshizawa Y, Ohtani Y, Hayakawa H, Sato A, Suga M, Ando M. Chronic hypersensitivity pneumonitis in Japan : a nationwide epidemiologic survey. *J Allergy Clin Immunol.* **103** : 315-320, 1999.
- 13) Nishiura Y, Nakagawa-Yoshida K, Suga M, Shinoda T, Gueho E, Ando M. Assignment and serotyping of *Trichosporon* species : the causative agents of summer-type hypersensitivity pneumonitis. *J Med Vet Mycol.* **35** : 45-52, 1997.
- 14) Gueho E, Smith MT, de Hoog GS, Billon-Grand G, Christen R, Batenburg-van der Vegte WH. Contributions to a revision of the genus *Trichosporon*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **61** : 289-316, 1992.
- 15) Sugita T, Ikeda R, Nishikawa A. Analysis of *Trichosporon* isolates obtained from the houses of patients with summer-type hypersensitivity pneumonitis. *J Clin Microbiol.* **42** : 5467-5471, 2004.
- 16) Mizobe T, Yamasaki H, Doi K, Ando M, Onoue K. Analysis of serotype-specific antibodies to *Trichosporon cutaneum* types I and II in patients with summer-type hypersensitivity pneumonitis with monoclonal antibodies to serotype-related polysaccharide antigens. *J Clin Microbiol.* **31** : 1949-1951, 1993.
- 17) 安藤正幸 過敏性肺炎の病態と治療 *日内学会誌.* **89** : 1717-1727, 2000.
- 18) Mizobe T, Ando M, Yamasaki H, Onoue K, Misaki A. Purification and characterization of the serotype-specific polysaccharide antigen of *Trichosporon cutaneum* serotype II : a disease-related antigen of Japanese summer-type hypersensitivity pneumonitis. *Clin Exp Allergy.* **25** : 265-272, 1995.
- 19) Miyake S, Hamaoka A, Yoshizawa Y. [Clinical usefulness of antigen-captured ELISA method using mouse anti-*Trichosporon asahii* monoclonal antibody D-8 for diagnosis of summer-type hypersensitivity pneumonitis]. *Nihon Koryuiki Gakkai zasshi = the journal of the Japanese Respiratory Society.* **39** : 7-11, 2001.
- 20) 三宅修司, 浜岡章, 吉澤靖之. マウス抗*Trichosporon asahii*モノクローナル抗体D-8を用いた抗原接合ELISA法による夏型過敏性肺炎診断の有用性について. *日呼吸会誌.* **39** : 7-11, 2001.
- 21) 溝部孝則, 足立照士, 浜岡章, 安藤正幸. 夏型過敏性肺炎のEnzyme-Linked Immunosorbent Assayによる血清診断の有効性の検討 *アレルギー.* **51** : 20-23, 2002.