

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16185

研究課題名(和文) PET/MRイメージングを用いた難診断深在性真菌症の新規画像診断法の開発

研究課題名(英文) Research for novel imaging diagnosis for fungal diseases

研究代表者

藤本 寛樹 (Fujimoto, Hiroki)

大阪市立大学・大学院医学研究科・学外研究員

研究者番号：80779489

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：深在性真菌症ムーコル症の特異抗体を用いてその画像診断の可能性を検討した。ムーコル症の原因微生物の代表であるRhizopus oryzae由来の蛋白(RSA：23kDa)を精製して、ウサギに免疫してポリクローナル抗体を作成し、抗原検出キットを作成した(特許習得済み)。その後、RSAのモノクローナル抗体の精製に成功した。抗体を用いた免疫染色では、感染マウス肺組織中の真菌を確認することができた。一方、抗体をラジオアイソトープでラベルしてPET/CTにて画像検出を試みたが、肺内にうまく描出できなかった。今後、抗体の条件等の再検討が必要と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

侵襲性アスペルギルス症に関するPET/MR検査の有用性が海外より報告されているが、国内において研究は行われていない。また、ムーコル症についてはR.oryzaeの特異抗原(RSA)以外に有用なマーカーは報告されておらず、PET/MRを使用した画像診断への応用についても行われていなかった。本研究は、従前には無かったムーコル症への早期かつ非侵襲的な検査の実現に向けた基礎的な検討であると位置づけられる。今回は最終段階へは到達できなかったが、現在早期診断が難しいムーコル感染症の新規画像診断へ発展する可能性を有している。また、深在性真菌症のみならず、難診断の感染症診療に新展開をもたらす研究と考える。

研究成果の概要(英文)：Mucormycosis is a life-threatening lung disease cause by mucor spp. The basic study for diagnostic imaging of mucormycosis using specific antigen for Rhisopus oryae, namely RSA, was done. The monoclonal RSA antibody was prepared. Tissue section of R. oryzae infected mouse lungs stained with RSA antigen. And we tried to detect R. oryzae in infected mice using intravenously injected radioisotope labeled RSA monoclonal antibody, but fungus was not detected outside of mouse body. The study will be continued.

研究分野：感染症

キーワード：ムーコル症 特異抗体 画像診断

1. 研究開始当初の背景

ムーコル症とは、*Rhizopus* 属、*Rhizomucor* 属、*Mucor* 属などのケカビ (Mucorales) 目に属する多様な真菌により引き起こされる感染症である。肺や鼻腔、中枢神経、皮膚等に病変を生じる。ムーコル症は造血幹細胞移植患者の報告では、侵襲性アスペルギルス症、侵襲性カンジダ症に次ぐ第3位の深在性真菌症であり、近年その発症頻度は増加傾向である。現在、その診断は真菌培養と病理学的診断にて行われるが、患者の全身状態が不良であるために侵襲的検査が極めて困難な状況であり、そのため生前診断が困難な場合が多い。その理由の一つは、ムーコル症の早期診断法が未だ開発されていないためである。ムーコル症の治療には高用量 (保険適用量を超える 5-10mg/kg/日) のアムホテリシン B リポソーム製剤 (L-AMB) が第一選択薬として推奨されるが、L-AMB 高用量投与時には本剤の副作用も危惧される。患者背景や画像診断からは、頻度の高い侵襲性アスペルギルス症との鑑別は難しい。アスペルギルス症の第一推奨薬であるボリコナゾール (VRCZ) はムーコル症には無効である。一方で、侵襲性アスペルギルス症のスクリーニングに用いられるアスペルギルスガラクトマンナン抗原検査や β -D-グルカン検査の感度・特異度は限られており、ムーコル症を積極的にスクリーニングするための早期診断法の開発が求められている。当教室では、ムーコル症の原因微生物の代表である *Rhizopus oryzae* 由来の特異蛋白 (Rhizopus-specific Antigen; RSA、23kDa) を精製して、ウサギに免疫してポリクローナル抗体を作成し、抗原検出キット (ELISA 法) を作成した。マウス感染モデルでは、感染マウスの4日目の血清中に RSA を検出することに成功し、論文報告している ((Sato K, et al. Identification of a Novel Rhizopus-specific Antigen by Screening with a Signal Sequence Trap and Evaluation as a Possible Diagnostic Marker of Mucormycosis. Med Mycol, 2017)。また RSA および検出法は特許を取得している。

2016年、アスペルギルス特異抗体を用いてアスペルギルス症を PET/MR にて診断する画像診断の研究論文が発表された (Rolle AM, et al. ImmunePET/MR imaging allows specific detection of *Aspergillus fumigatus* lung infection in vivo. PNAS, E1026-E1033, 2016)。本論文で使用された JF5 抗体は *A. fumigatus* 特異抗体であり、標識された本抗体を経静脈的に投与することで感染マウス肺内の *A. fumigatus* を免疫染色で検出することに成功した。また、本抗体に放射性同位物質 [^{64}Cu] をラベルして経静脈的に投与することで PET/MR にて *A. fumigatus* を検出できることを報告している。同様に難診断の深在性真菌症であるムーコル症に対して RSA に対する特異抗体を用いた非侵襲的画像診断の試みを行った。

2. 研究の目的

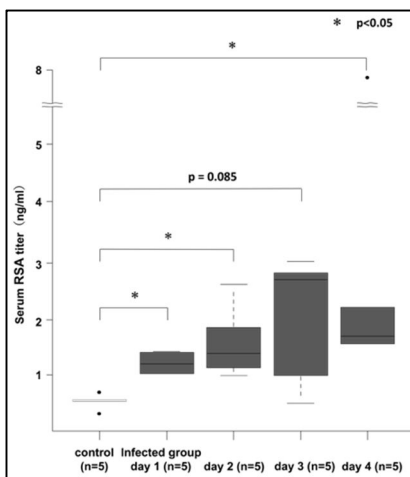
本研究は *R. oryzae* の由来の RSA に対する特異抗体を用いた画像診断開発の基礎研究である。今後、非侵襲的なムーコル症の診断に繋がるものと期待できると考えられ、研究を実施した。

3. 研究の方法

- (1) モノクローナル抗体の作成
- (2) モノクローナル抗体を用いた ELISA 法による *R. oryzae* 感染マウスの血清および肺胞洗浄液中からの RSA 検出評価
- (3) 抗 RSA 抗体を使用した免疫染色による病理組織上の真菌検出
- (4) 放射性同位物質でラベルした抗 RSA 抗体を尾静脈より投与して、*R. oryzae* 肺感染マウスの画像検査

4 . 研究成果

ムーコル症の代表真菌である *R. oryzae* の由来の RSA を認識する特異抗体を用いて画像診断の可能性を検討した。(1)大阪市立大学工学部との共同研究にて RSA に対するモノクローナル抗体の精製に成功した。また RSA は *R. oryzae* の培養上清中に経時的に増加することから、RSA は分泌抗原であることが示唆された。(2)また *R. oryzae* 感染マウスを用いた ELISA 法による RSA の検出の検討では、感染マウスから連日(感染後 1 4 日)血清や肺胞洗浄液を得て、早期診断に有用かどうかを検討した。その結果、感染翌日の血清や肺胞洗浄液中に RSA が検出され、その後経時的に RSA 量は増加していた。病理組織学的検査では、感染 2 ~ 3 日後にはマウス肺組織中に菌糸が認められたが、感染翌日は菌糸が検出できない程度である。そのため、感染翌日に血清や肺胞洗浄液中に RSA が検出されたことは、抗 RSA モノクローナル抗体を用いた検出法が本症の早期診断に有用であることを示唆している。またムーコル症と考えられる患者(病理組織にてムーコル属を確認)より得られた血清や肺胞洗浄液中に RSA が検出され論文報告した。(Shibata W, Niki M, Sato K, Fujimoto H, Yamada K, Watanabe T, Miyazaki Y, Asai K, Obata Y, Tachibana T, Kawaguchi T, Kaneko Y, Kakeya H. Detection of Rhizopus-specific antigen in human and murine serum and bronchoalveolar lavage. Med Mycol. 2020 Oct 1;58(7):958-964. doi: 10.1093/mmy/myaa001.) (3) 抗 RSA モノクローナル抗体を用いた免疫染色では、感染マウス肺組織中の真菌 (*R. oryzae*) を検出することが確認されたが、RSA が菌体表面に存在する可能性が示唆された。(4)一方、ラジオアイソトープでラベルした抗 RSA 抗体を尾静脈より投与して、*R. oryzae* 肺感染マウスを PET/CT (理化学研究所(神戸)にて実施)にて画像検出を試みたが、肺内にうまく描出できなかった。今後、抗体の条件等の再検討が必要と考えられた。



感染マウス血清中より経時的に RSA が検出された(左図)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Wataru Shibata, Mamiko Niki, Kanako Sato, Hiroki Fujimoto, Koichi Yamada, Tetsuya Watanabe, Yoshitsugu Miyazaki, Kazuhisa Asai, Yoko Obata, Taro Tachibana, Tomoya Kawaguchi, Yukihiro Kaneko, Hiroshi Kakeya	4. 巻 -
2. 論文標題 Detection of Rhizopus-specific antigen in human and murine serum and bronchoalveolar lavage	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Medical Mycology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/mmy/myaa001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Wataru Shibata, Hiroki Fujimoto, Koichi Yamada, Mamiko Niki, Satoshi Yamagoe, Yoshitsugu Miyazaki, Yukihiro Kaneko, Hiroshi Kakeya.
2. 発表標題 Detection of Rhizopus oryzae specific antigen (RSA) in serum and bronchial alveolar lavage is a potential early diagnostic marker in mucormycosis by R. oryzae
3. 学会等名 IDWeek2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 掛屋 弘、藤本寛樹
2. 発表標題 ムーコル症のトピックス
3. 学会等名 第30回日本臨床微生物学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

〔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

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
---------	---------