

機関番号：13401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591199

研究課題名（和文） 細胞壁構成成分を指標とした細菌・真菌感染症の病態解析と分子イメージングへの展開

研究課題名（英文） Pathophysiological analysis of infectious diseases *in vivo* using [¹⁸F]N-acetyl-glucosamine, a newly synthesized radio-compound for positron emission tomography.

研究代表者

稲井 邦博 (INAI KUNIHRO)

福井大学・医学部・助教

研究者番号：30313745

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、細菌・真菌感染症の病態を、それらの挙動を生体内で動的に捉えられる方法を開発し、それを駆使して早期診断技術の構築に繋げることである。具体的には、細菌・真菌の細胞壁構成基質である UDP-N-アセチルグルコサミン (UDP-GlcNAc)、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 等の細胞壁構成基質の放射性同位元素を用い、オートラジオグラフィの手法を駆使して *in vivo* で病原体の挙動を同定して病理学的手法で感染症病態を明らかにし、さらに分子イメージングへの展開を図り、これらの基質を利用した体外診断法の確立を目指す。

そのため、UDP-GlcNAc 並びに GlcNAc が細菌・真菌に特異的に集積する事を *in vitro* 培養系、及び *in vivo* オートラジオグラフィ法で明らかにした。さらに、生体内に存在する病原体の局在部位を非侵襲性に検出するために、独自に合成法を確立した ¹⁸F-GlcNAc を合成する技術を開発して、免疫抑制後に病原微生物を感染させた動物に投与して labeling 後、PET 撮影を行い径 2mm 程度以上の病巣を非侵襲的かつ再現性良好に撮像できる技術を開発した。また、この各核種は関節リウマチや異物投与によって生じるような、非感染性炎症は描出しないことも確認し、感染病巣を非侵襲的に体外診断できる可能性あることが明らかになった。

これらの基礎技術は「真菌・細菌の画像化方法」として特許出願（特許公開 2008-206444）し、また研究成果は Nuclear Medicine and Biology 誌に掲載が決定した。

研究成果の概要（英文）：

Infection is one of the serious disorders in which pneumonia is the 4th leading course of death in Japan. In addition, immunocompromised hosts including elderly persons, children, and patients with cancer, diabetes mellitus, or AIDS, often complicate with severe infectious diseases. One of the reasons is both early and exact diagnostic inspections for infectious diseases are few, and objective clinicopathological analyses are often forced to wait for the results of autopsy. Therefore, treatment of the infectious diseases still depends much on empiric therapy. In past several years, we investigated the new diagnostic imaging of infection sites *in vivo* and found that the ³H-labeled N-acetyl-glucosamine was specifically accumulated in the cell wall of both bacteria and fungus (Noriki S, Inai K, et al. Japanese Unexamined Patent Application Publication, No. 2007-046292).

We extended to develop the molecular probe based on NAG and succeeded to visualize bacterial infection sites in the living body using [¹⁸F]N-acetyl-glucosamine probe by PET without showing other non-infectious inflammatory lesions including rheumatoid arthritis and foreign body injection. These findings suggest this technology would expect to be available for early diagnosis of infectious diseases, for assessing the effects of antimicrobials in a same person or a same animal, and for differential diagnosis with

or without the association of infection in patients with fever of unknown origin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：感染症診断学

1. 研究開始当初の背景

(1) 抗生物質が普及した現在でも、厚労省の「人口動態統計」で死因4位に肺炎が位置するなど感染症は重要な疾患で、悪性腫瘍や脳血管障害患者にも高率に合併する。とくに細菌・真菌感染症では抗菌化学療法が有効なため、早期治療に繋がる確実な病原体検出が重要となってくる。通常、感染症診断は病原体の培養同定と、それに続く抗生物質感受性試験をもってなされるが、最も診断特異性の高い血液中からの病原体検出率は20%にも満たず、また数日から1週間程度の日数を要する。最近、DNA microarray法を応用した感染症早期診断の取り組みが一部で始まっているが、病原体検出にはまだ2日程度必要で、検出率は血液培養と同程度に留まっている。したがって、発症初期は病原体の存在も不明な状態でempiricな対応を行わざるを得ず、血液・免疫疾患患者、乳幼児、高齢者などに感染症が発症するとしばしば重症化する。このような現状から、細菌・真菌の有無を発症初期から確実、且つ可能な限り非侵襲性に診断できる技術の確立が急務となっているが、生体内での病原体の挙動を解析する適当な手段がほとんど無く、発症初期段階からの早期診断に繋がる研究はほとんどなされていない。

(2) そこで、研究代表者の稲井は感染症・血液疾患・悪性腫瘍の診療、研究(Int J Hematol 1997, Leukemia Res 2000, Mol Cancer Ther 2006, 特許申請 2007-007561、他)、及び造血器悪性腫瘍に合併する重症感染症の病理学的研究(Int J Hematol, 2007)に従事してきた経験から、細菌・真菌の生体内での動態を直接検討できないかと考えた。具体的には、細菌・真菌に共通する細胞壁の構成成分であるキチン合成の基質であるN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)、並びにUDP-GlcNAcに

着目した。尾静脈からの真菌接種を行い、真菌を感染させたマウスに、腹腔、あるいは経静脈的にトリチウム(³H)で標識したGlcNAc(³H-GlcNAc)を投与する予備的実験で、³H-GlcNAcは投与後わずか2時間で極めて選択的に真菌の細胞壁内に集積することを見出した(特許出願 2007-046292)。次に、*in vitro*培養系でアスペルギルス、大腸菌、及び各種ヒトがん細胞株(胸腺癌、肝癌、乳癌、腎癌、Tリンパ腫、骨髄性白血病)に³H-GlcNAc、及び³H-UDP-GlcNAcを添加し、2時間培養後の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。右図に示すように、³H-GlcNAc、³H-UDP-GlcNAcのいずれもアスペルギルス、大腸菌に取り込まれたが、とくに³H-GlcNAcにおいて顕著であった。一方、ヒト細胞株では一部で軽度の上昇が見られたものの、ほとんどの細胞株で測定限界下限レベルに留まっていた。

2. 研究の目的

(1) GlcNAcなどの細胞壁合成基質は*in vitro*のみならず、*in vivo*における細菌・真菌のkinetics解析、抗生物質反応性、病態解析や診断技術開発へ応用できると予測しており、本研究では細胞壁合成基質を利用して微生物の生体内での動態を解析するとともに、これらの基質を利用した分子イメージング薬の開発を目指し、感染症の体外診断に繋げることを目的とする。上述した作業仮説に基づき、本研究では(1)細菌・真菌の動態解析に至適な細胞壁合成基質の同定を行い、(2)それらが細菌・真菌の生体内での挙動を反映するか否か、(3)感染症の重症度解析や、抗生物質などの治療効果判定に応用可能か否かの3点に焦点を当て、細菌・真菌学的手法、病理学的手法、及びラジオイムノアッセイを駆使して解析する。さらに将来の臨床応

用も見据え(4)生体内の微小病変を非侵襲的に描出できる PET (Positron emission tomography) への応用を探るために、¹⁸F-GlcNAc を合成して PET による体外からの病原体撮像の可能性を放射線医学的に検討し、病理学的に検証する。

3. 研究の方法

(1) ³H-GlcNAc の細菌、真菌、及びヒトがん細胞株への取り込み

GlcNAc は細菌・真菌の細胞壁構成成分であるが、ヒトの生体内にも存在することが知られている。そこで、³H-GlcNAc の細胞への集積を *in vitro* 培養系で検討した。1 mCi/ml の ³H-GlcNAc を、対数増殖期の *E. coli* (ATCC No. 8739), *S. aureus* (ATCC 6538), *S. epidermidis* (ATCC 12228), *E. faecalis* (ATCC29212), *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *K. pneumoniae* (ATCC 8308), *C. albicans* (ATCC 2091) *A. niger* (ATCC 16888), *C. neoformans* (ATCC 14116)、及びヒト胎児腎由来 HEK293 細胞、骨髄性白血病 K562 細胞株、胸腺癌 ThyL-6 細胞株、乳癌細胞株 MDA-MB-231 に添加し、37°C で 2 時間培養後の細胞内 ³H-GlcNAc レベルを液体シンチレーションカウンターで測定し、測定データは単位たんぱく質あたりに換算し比較した。

(2) ³H-GlcNAc の生体内感染巣への集積

[¹⁸F]FDG-PET で感染病巣が描出できるとされるが、それは核種が病原体に直接集積するのではなく、感染症周囲の炎症細胞に集積することによる描画と考えられる。そこで、³H-GlcNAc が生体内で病原体自身に特異的に集積するかを検討するために、*in vivo* オートラジオグラフィーを施行した。90mg/kg のシクロフォスファミドで免疫抑制したマウスの尾静脈から *A. niger* を静注して感染を成立させた。感染成立後、³H-GlcNAc を腹腔内投与し、2 時間後に屠殺して薄切組織標本作製し、この標本を用いてオートラジオグラフィーを施行した。オートラジオグラフィーでの ³H-GlcNAc 取り込み部位は、連続切片として作成した HE 染色標本、グロコット染色標本と検鏡により確認した。

(3) Chitinase 処理によるオートラジオグラフィーの減弱

オートラジオグラフィーでは、放射性核種の非特異的沈着による偽陽性が生じる可能性があるが、³H-GlcNAc が細菌・真菌の細胞壁に集積されていれば、現像前に chitinase 処理で細胞壁を分解するとシグナルの減弱が生じることから、特異的に細胞壁に取り込まれたことが確認できる。そこで、現像前に chitinase 処理を行い、³H-GlcNAc シグナルの減弱が生じるか否かを検討した。

(4) ¹⁸F-GlcNAc (FAG) の体内分布と排洩

¹⁸F-GlcNAc の体内動態を検証するため、0.1 mCi の ¹⁸F-GlcNAc をマウス尾静脈から静注した。静注後 90 分まで経時的にマウスを屠殺し、血中並びに各組織に分布する ¹⁸F-GlcNAc 濃度をガンマカウンターで計測した。

(5) ¹⁸F-GlcNAc による感染巣の撮像と病理組織

¹⁸F-GlcNAc による感染巣の *in vivo* 撮像が可能か否かを検討するため、シクロフォスファミドで免疫抑制したマウス大腿部に *E. coli* を局所注入し、感染巣を作成した。その後、尾静脈より ¹⁸F-GlcNAc を静注して 1 時間ラベリングを行い、動物用 PET 撮影装置で 30 分間撮影を施行した。撮影終了後直ちにマウスを屠殺してホルマリン固定し、病理標本作製した。

(6) ¹⁸F-GlcNAc と ¹⁸F-FDG による感染病巣撮像の比較

既にごん診断などで臨床応用されている ¹⁸F-FDG は、エネルギー代謝の盛んな組織に取り込まれることから、感染症領域でも利用が試みられているが特異性に乏しく、非感染性炎症巣も描出されると考えられている。一方 ¹⁸F-GlcNAc は感染巣を特異的に描出することが期待される。そこで、感染巣あるいは非感染性炎症巣を有する単一個体で、連続的に ¹⁸F-GlcNAc と ¹⁸F-FDG による病巣の撮影を試み、¹⁸F-GlcNAc の感染病巣に対する特異性を検証した。シクロフォスファミドで免疫抑制したラット肩関節周囲に、*E. coli* またはクロトンオイルを局所注入し病巣を作成した。作成後、¹⁸F-GlcNAc を尾静脈より静注して 1 時間ラベリングを行い、動物用 PET 撮影装置で 30 分間撮影を施行した。動物はそのまま飼育し、翌日 ¹⁸F-FDG を用いて同様の撮影を行い、結果は SUV を用いて比較検討した。

4. 研究成果

(1) ³H-UDP-GlcNAc は *in vivo* で細菌・真菌に特異的に集積する。

細菌・真菌の細胞壁構成基質キチンは UDP-GlcNAc を前駆物質にして生合成される。そこで、UDP-GlcNAc が生体内で細胞壁に取り込まれるか否か、オートラジオグラフィーで検討した。4~6 週齢雄マウス (ddy strain) の尾静脈より *Aspergillus* 混濁液を約 0.1 ml 注射し、感染が成立した 3~5 日後に、³H-UDP-GlcNAc を腹腔内に投与し、投与後約 2 時間で安楽死させ、各臓器の病理標本作製した。この標本を用いて、オートラジオグラフィーを行った。その結果、腎盂のアスペルギルスの菌糸に一致してトリチウムに露光

した黒い粒子が認められた。一方、背景の好中球など炎症細胞への取りこみはなく、大腸などの腸内細菌への取りこみも認められなかった。また、関節など他臓器への取りこみも認められなかった。

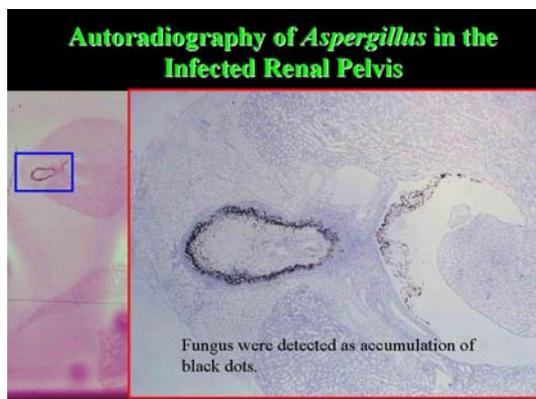


図 1

さらに、トリチウムが確かに細胞壁集積しているかを検証するために、オートラジオグラフィ施行前に標本をキチン分解酵素処理すると、集積が減弱することより、投与された $^3\text{H-UDP-GlcNAc}$ が、真菌の細胞壁に取り込まれたことが確かめられた。

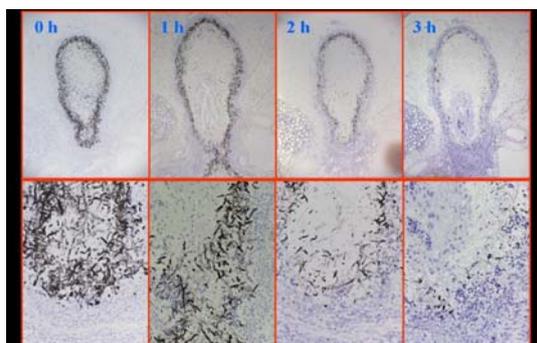


図 2

(2) $^3\text{H-GlcNAc}$ も細菌・真菌に特異的に集積する。

細菌・真菌は 2 段階の酵素反応を経て、GlcNAc から UDP-GlcNAc を合成していることが知られている。既に GlcNAc はサプリメントとしてヒトに投薬され、その安全性が示されており、GlcNAc が利用できれば安全性の点で、さらに有利かと思われる。そこで、 $^3\text{H-GlcNAc}$ が細菌・真菌に特異的に取り込まれるかを *in vitro* 培養系で検討した。グラム陽性菌、グラム陰性菌、真菌細胞株各 3 種類ずつ、ヒト腫瘍細胞株 4 株に、 $^3\text{H-GlcNAc}$ を添加して 2 時間培養後に、細胞を集めて洗浄し、各細胞内のトリチウムレベルを液体シンチレーションカウンターで計測し、タンパク量毎に補正して比較検討した。トリチウムレベルの最も低いヒト乳癌 MDA-MB-231 細

胞でのトリチウムレベルを 1 とすると、ヒトがん細胞株では 1.5~3.5 倍に留まったが、真菌細胞株 33~530 倍、グラム陽性菌 150~1380 倍、グラム陰性菌 400~2035 倍と著明な集積が認められた。また、この集積は過量の GlcNAc を培養上清中に添加しておくと同様に抑制された。

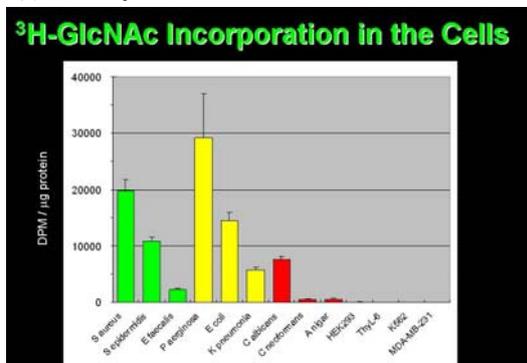


図 3

さらに、 $^3\text{H-UDP-GlcNAc}$ と同様に $^3\text{H-GlcNAc}$ を用いて、*in vivo* でオートラジオグラフィを施行すると、 $^3\text{H-GlcNAc}$ が細菌や真菌に集積する画像が確認された（データ示さず）。

(3) $^{18}\text{F-GlcNAc}$ の体内分布

これまでの実験で UDP-GlcNAc、GlcNAc とともに生体内で細菌・真菌に特異的に集積することが示唆されたため、 $^{18}\text{F-GlcNAc}$ を用いて *in vivo* imaging を施行する際の条件設定のために、まず $^{18}\text{F-GlcNAc}$ の生体内分布を検討した。0.1mCi の $^{18}\text{F-GlcNAc}$ をマウス尾静脈から静注し、静注後の組織内分布を 90 分まで経時的に検討した。 $^{18}\text{F-GlcNAc}$ は腎排泄を示すため、図 4、図 5 に示すように投与 5 分後には腎臓に強い集積を示した。その後 60 分まで他の臓器よりも放射線レベルの上昇が認められたが、60 分後には他臓器と同等レベルまで低下した。

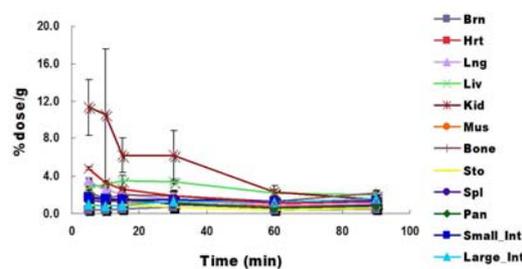


図 4

一方、既に臨床応用されている FDG が強く集積する脳や心臓に、 $^{18}\text{F-GlcNAc}$ はごく軽度集積するのみであった。この結果より $^{18}\text{F-GlcNAc}$ による *in vivo* 撮影のための labeling time は 1 時間が適切と考えられた。

(4) ^{18}F -GlcNAc による感染巣の撮影と病理学的検索。

FAG による感染巣の *in vivo* 撮影が可能かを検証するために、シクロフォスファミドで免疫抑制したマウスの右大腿に *E. coli* を注入し感染巣を作成後に ^{18}F -GlcNAc を静注してラベリングを行い PET 撮影した。撮影終了後、マウスを屠殺してホルマリン固定し、組織標本を作製した。病理学的に検証することで、PET 撮像結果と実際の感染巣が一致するか否かを検証した。

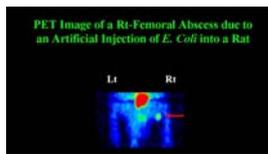


図 5

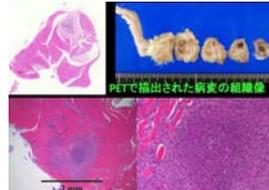


図 6

図 5 に示すように、大腸菌を注入した病変に一致して (赤矢印) ^{18}F -GlcNAc の集積が認められたが、感染巣を作成していない反対側には集積は認められなかった。また、腎排泄を反映して膀胱には強い集積が認められた。

次に、同部位の病理組織標本を作製すると、左大腿筋内に直径 2mm 程度の膿瘍が検出され、 ^{18}F -GlcNAc はこの病変を描出していると考えられた (図 6)。

(5) ^{18}F -GlcNAc と FDG の比較

FDG は炎症巣にも集積することから感染症にも利用が試みられているが、特異性は乏しい。一方 ^{18}F -GlcNAc は感染巣を特異的に描出することが期待される。そこで、感染巣あるいは非感染性炎症巣を有する単一動物で、連続的に ^{18}F -GlcNAc と FDG による病巣の撮影を試み、感染病巣に対する特異性を比較検討し、結果は SUV を用いて比較検討した。

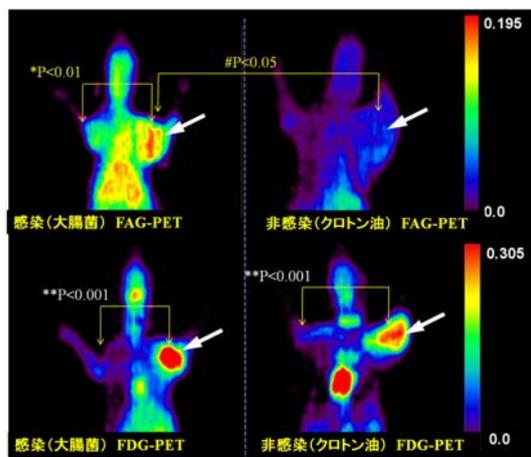


図 7

図 7 に示すように、感染巣は ^{18}F -GlcNAc (左上)、FDG (左下) のいずれでも描出された。一方、クロトンオイル注入により作成された非感染性炎症巣に対して、FDG は有意に集積した (右下) が、 ^{18}F -GlcNAc の集積は認め

られなかった (右上)。

次に、SUV 値を計算して集積を半定量的に数値化すると (表 1)、 ^{18}F -GlcNAc での感染巣と非感染巣間のターゲット領域と非ターゲット領域の比 (T/NT) は、感染巣 2.84、非感染巣 1.39 で、これは既報における $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -UBI 29-41 を用いた SPECT における感染巣・非感染巣のそれぞれの SUV 値、2.3~3.3、1.41 と同等であった。

表 1

感染ラット、非感染炎症ラットにおける Standardized Uptake Value (SUV)

Model	Infective (SUV)			Non-infective inflammation (SUV)		
	Target area	Non-target area	T/NF ratio	Target area	Non-target area	T/NF ratio
[^{18}F]FAG	0.54 ± 0.11*	0.19 ± 0.07	2.84	0.32 ± 0.10	0.23 ± 0.10	1.39
[^{18}F]FDG	1.58 ± 0.12**	0.22 ± 0.08	7.18	1.38 ± 0.10*	0.23 ± 0.08	4.88

T/NT: Target area/Non-target area
 *P<0.01 versus the non-target areas in same model
 **P<0.001 versus the non-target areas in same model
 #P<0.05 versus the target areas in inflammation model
 Values represent the mean ± SD (n=6)

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -UBI 29-41 は SPECT でのデータであり、一概に比較はできないものの、 ^{18}F -GlcNAc による本研究での測定結果は、臨床への応用に十分期待の持てる結果と考えられた。

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 7 件)

- ① Martinez ME, Kiyono Y, Noriki S, Inai K, 他 8 名. New Radiosynthesis of 2-deoxy-2-[^{18}F]fluoroacetamido-*D*-glucopyranose and its evaluation as a bacterial infections imaging agent. Nucl Med and Biol, 査読有、*in press*、
- ② 高木和貴、稲井邦博、内木宏延、岩崎博道、上田孝典、炎症性サイトカイン過剰産生ヒト胸腺癌細胞株 (ThyL-6) における Flavopiridol による転写抑制を介した IL-6 分泌抑制、痛風と核酸代謝、査読有、Vol. 34、2010、179-187、
- ③ 津谷 寛、稲井邦博、痛風の診断・鑑別診断、総合臨床、査読無、Vol.59、2009、231-236、
- ④ Ikegaya S, Inai K, Iwasaki H, Naiki H, Ueda T. Azithromycin reduces tumor necrosis factor-alpha production in lipopolysaccharide-stimulated THP-1 monocytic cells by modification of stress response and p38 MAPK pathway. J Chemother, 査読有、Vol.21、2009、396-402、
- ⑤ 稲井邦博、酒巻一平、尿酸ナトリウム一

水和物結晶(monosodium urate crystals)のアジュバント作用、臨床免疫・アレルギー科、査読無、Vol.51、2009、526-532、

- ⑥ Inai K, Takagi K, Takimoto N, Okada H, Imamura Y, Ueda T, Naiki H, Noriki S. Inflammatory cytokine-productive Thyl-6 cell line established from a patient with thymic carcinoma. Cancer Sci、査読有、Vol.99、2008、1778-1784、
- ⑦ Sakamaki I, Inai K, Tsutani Y, Ueda T, Tsutani H. Binding of monosodium urate crystals with idiotypic protein efficiently promote dendritic cells to induce cytotoxic T cells. Cancer Sci、査読有、Vol.99、2008、2268-2273、

[学会発表] (計3件)

- ① Martinez ME, Kiyono Y, Ido T, Noriki S, Inai K, 他3名. Evaluation of 2-deoxy-2-[¹⁸F]fluoroacetamido-D-glu copyranose as a infections imaging agent for PET. 23rd Annual Congress of The European Association of Nuclear Medicine -EANM'10. 2010.10.9. Vienna (Austria)
- ② Martinez ME, Ido T, Kiyono Y, Noriki S, Inai K, 他3名. Radiosynthesis of 1,3,4,6-tetra-o-acetyl-2-deoxy-2-([¹⁸F]fluoroacetamido)-D-glu copyranose for imaging of bacterial infections. 18th International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences. 2009, 07, 12. Edmonton (Canada)
- ③ Inai K, Noriki S, Iwasaki, H, 他2名. Pathophysiological approach against resistant bacteria-causing infectious diseases; - from autopsy findings to clinical applications-. Ehrlich II 2nd World Conference on Magic Bullet. 2008.10.8, Nurnberg (Germany)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

名称：真菌・細菌の画像化方法
発明者：法木左近、稲井邦博、藤林康久、岩崎博道
権利者：国立大学法人福井大学

種類：特許公開
番号：2008-206444
出願年月日：19年2月26日
国内外の別：国内

名称：イディオタイプ抗原用担体およびそれを用いたイディオタイプワクチン
発明者：津谷 寛、酒巻一平、稲井邦博、上田孝典
権利者：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団、国立大学法人福井大学
種類：特許公開
番号：2008-174466
出願年月日：19年1月17日
国内外の別：国内

○取得状況 (計1件)

名称：サイトカイン産生ヒト細胞株
発明者：稲井邦博、高木和貴、内木宏延、上田孝典
権利者：国立大学法人福井大学
種類：特許
番号：特許第4238366号
取得年月日：21年1月9日
国内外の別：国内

[その他]
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲井 邦博 (INAI KUNINIRO)
福井大学・医学部・助教
研究者番号：30313745

(2) 研究分担者

法木 左近 (NORIKI SAKON)
福井大学・医学部・准教授
研究者番号：30228374
井戸 達雄 (IDO TATSUO)
福井大学・高エネルギー医学研究センター・客員教授
研究者番号：80134063
藤林 康久 (FUJIBAYASHI YASUHISA)
福井大学・高エネルギー医学研究センター・教授
研究者番号：50165411

(H20~H21)

清野 泰 (KIYONO YASUSHI)
福井大学・高エネルギー医学研究センター・准教授
研究者番号：50305603

(H22)

(3) 連携研究者

なし