

令和元年6月16日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09939

研究課題名(和文) 難診断深在性真菌症の早期診断法の開発

研究課題名(英文) Detection of *Rhizopus oryzae* specific antigen (RSA) in serum and bronchial alveolar lavage is a potential early diagnostic marker in mucormycosis by *R. oryzae*

研究代表者

掛屋 弘 (KAKEYA, Hiroshi)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：40398152

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：白血病疾患等の高度免疫抑制患者に見られる深在性真菌症の中でムーコル症は、早期診断法が未だ開発されておらず、生前診断は困難であることが多い。我々は新規蛋白研究法であるシグナルシークエンストラップ法を用い、早期診断に有用と考えられる新規蛋白抗原を選出した。その候補A抗原(特許申請済)は分泌蛋白で、感染マウス血清中で検出されることを報告している。今回、モノクローナル抗体の作成に成功した。さらに本抗体を用いたELISA法による検査にて*R. oryzae*感染マウスの血清中および肺胞洗浄液中に感染初日から抗原は検出され、早期診断に有用であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

白血病疾患等の高度免疫抑制患者に見られる深在性真菌症の中でムーコル症は、早期診断法が未だ開発されておらず、生前診断は困難であることが多い。我々が注目しているA抗原は分泌蛋白で、感染マウス血清中で検出されることを報告している。今回、モノクローナル抗体の作成に成功し、本抗体を用いたELISA法による検査にて*R. oryzae*感染マウスの血清中および肺胞洗浄液中に感染初日から抗原は検出された。これらの結果から、本検査法は*R. oryzae*によるムーコル症の早期診断に有用であることが示唆された。さらなる臨床応用にてヒトムーコル症の早期診断につながるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：The diagnosis of mucormycosis was made by the identification of organism in the histopathology with culture confirmation. We reported a novel *Rhizopus*-specific antigen (23kDa, named protein RSA) by screening with a signal sequence trap was detected at significantly higher concentrations in serum and in lung homogenates in the infected mice on day 4. And the results were suggested RSA was a possible diagnostic marker of mucormycosis (Sato K, et al. Medical Mycology, 2017, 55,713-719).

We developed the ELISA Kit using monoclonal antibody for RSA. The mice were injected with cortisone acetate and cyclophosphamide, and *R. oryzae* was infected intratracheally. The RSA was detected in sera and BAL on day 1, 2, 3, and 4. The concentration of RSA in sera and BAL were significantly higher on day 1 as compared with uninfected mice. And the concentration of RSA in sera was upward trend through day 1 to 4. However, the concentration of RSA in BAL was stable through day 1 to 4.

研究分野：深在性真菌感染症

キーワード：ムーコル症 早期診断 蛋白抗原

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

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、深在性真菌症の中で発症頻度の増加傾向が報告されている。現在、その診断は専ら真菌培養と病理学的診断に頼っているが、患者の全身状態は不良で侵襲的検査が限られるため、生前診断が困難な場合が多い。その理由は、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、(わが国では未発売のポサコナゾール)と高用量(5-10mg/kg/日)のアムホテリシンB リポソーム製剤(L-AMB)が有効とされるが、高用量投与時には本剤の副作用も危惧される。一般的には保険適用量(L-AMB: 2.5-5mg/kg/日)を超える治療は実施されず、本症の予後は大変不良である。本症は頻度の高い侵襲性アスペルギルス症との鑑別が問題となるが、アスペルギルス症の第一推奨薬のポリコナゾール(VRCZ)はムーコル症には無効である。また、両者には基礎疾患が画像所見等の共通の点が多く、鑑別に苦慮する。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抗原検査や-D-グルカン検査の感度・特異度も限られているため、ムーコル症の早期診断法の開発が求められている。

2. 研究の目的

白血病疾患等の高度免疫抑制患者に見られる深在性真菌症の中でムーコル症は、早期診断法が未だ開発されておらず、生前診断は困難であることが多い。我々は新規蛋白研究法であるシグナルシークエンストラップ法(Kojima T, Kitamura T. A signal sequence trap based on a constitutively active cytokine receptor. Nat Biotechnol, 17:487-490, 1999)を用いてムーコル属の代表菌種である *Rhizopus oryzae* の臨床分離株より膜蛋白および分泌蛋白遺伝子の検出を試みた。その結果、公開されている *R. oryzae* のデータベース(http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/rhizopus_oryzae/MultiHome.html)を利用して、得られた302の候補蛋白の遺伝子同定を行った。その中から、最も多いクローン(163/302)を占めた未知の蛋白(候補A抗原: hypothetical protein、226アミノ酸、約23kDaの蛋白)を抗原の候補として選出した(特許申請済: 特許出願番号2016-227864; ムーコル症を診断/検査するためのツールおよび方法)。候補A抗原の遺伝子をクローニングして大腸菌で蛋白を発現・精製。その後、ウサギに免疫して抗体を精製。ELISAキットを作成して、その評価を行った。その結果、抗(候補A抗原)抗体による菌体の免疫染色の結果、および *R. oryzae* の培養上清中に経時的に増加することから、候補A抗原は菌体の表面に局在し、かつ分泌抗原であることが明らかとなった。この抗原の特徴は診断検査に理想的な抗原である可能性を有している。さらに、ELISAキットを用いて *R. oryzae* 感染マウス血清中から抗原Aが検出された。(本研究結果は、国際学会ICAAC/ICC2015(San Diego, USA)のポスターにて発表。その後、論文掲載された。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; 55(7): 713-719)。

今回は、上記研究に使用した抗体はウサギに免疫し得られたポリクローナル抗体であったため、データの安定化を目的として、抗原Aに対するモノクローナル抗体の作成を行い、再評価を試みた。さらに Med Mycol (2017) に論文報告したマウス血清は感染4日後(死亡直前)の血清であり、早期診断法として使用できるかどうか、不明であった。そのため今回は、感染初日より血清および肺胞洗浄液中に経時的に検出できるかどうかを検討し、早期診断法としての有用性を検討した。さらに臨床検体を集積中であるが、患者検体中に本抗原の検出を試みた。

3. 研究の方法

免疫抑制薬にて免疫不全マウスを作成し、*R. oryzae* を経気道的に感染させ、肺感染モデルを作成する。その後、感染初日、2日目、3日目、4日目と連日、感染マウスより血液および肺胞洗浄液を回収し、モノクローナル抗体を利用した新規 ELISA キットを使用して、抗原の検出を行った。さらに現在、臨床応用のためにムーコル症(疑いを含む)患者血清を収集中であるが、臨床検体の評価も実施する。

4. 研究成果

大阪市立大学工学研究科細胞工学研究室(立花太郎先生)との共同研究にて抗原 A に対するモノクローナル抗体の作成に成功した。さらにモノクローナル抗体を用いた ELISA 法による検査にて *Rhizopus oryzae* 感染マウス血清中に抗原の検出を試みた。その結果、*R. oryzae* 感染マウスの血清中および肺胞洗浄液中に感染初日から抗原を検出できることが明らかとなった。また、その抗原値は、経時的に増加する傾向が認められた。さらに、現在、臨床応用のためにムーコル症(疑いを含む)患者血清を収集中であるが、その中で当院にて経験した症例において本検査の有用性が示唆された(投稿準備中)。これらの結果は、抗原 A を検出する本検査法が *R. oryzae* 感染症の早期診断法として有用であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

1. Kawaguchi H, Yamada K, Imoto W, Yamairi K, Shibata W, Namikawa H, Yoshii N, Nakaie K, Okada Y, Fujita A, Shinoda Y, Nakamura Y, Kaneko Y, Nagayama K, Takeya H. The Effects of Antifungal Stewardship Programs at a Tertiary-Care Teaching Hospital in Japan. J Infect Chemother, 2019; 25:458-462. (査読あり)
2. Yamairi K, Ido K, Nakamura S, Niki M, Imoto W, Shibata W, Namikawa H, Fujimoto H, Yamada K, Nakamae H, Hino M, Kaneko Y, Miyazaki Y, Takeya H. Successful treatment of invasive pulmonary aspergillosis caused by *Aspergillus felis*, a cryptic species within the *Aspergillus* section *Fumigati*: A case report. J Infect Chemother. 2019; 25(4):307-310. (査読あり)
3. Namikawa H, Yamada K, Yamairi K, Shibata W, Fujimoto H, Takizawa E, Niki M, Nakaie K, Oinuma KI, Niki M, Takemoto Y, Kaneko Y, Shuto T, Takeya H. Mortality caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae bacteremia; a case control study: alert to Enterobacteriaceae strains with high minimum inhibitory concentrations of piperacillin/tazobactam. Diagn Microbiol Infect Dis. 2019 Jan 30. pii: S0732-8893(19)30100-2. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2019.01.018. [Epub ahead of print] (査読あり)
4. Sakurai N, Nakamura Y, Kawaguchi H, Abe J, Yamada K, Nagayama K, Takeya H. Measurement of Linezolid and its metabolites PNU-142300 and PNU-142586 in human

- plasma using ultra-performance liquid chromatography method. Chem Pharm Bull.2019; 67:439-444. (査読あり)
5. Namikawa H, Oinuma KI, Sakiyama A, Tsubouchi T, Tahara YO, Yamada K, Niki M, Takemoto Y, Miyata M, Kaneko Y, Shuto T, Takeya H. Discovery of anti-mucoviscous activity of rifampicin and its potential as a candidate anti-virulence agent against hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. Int J Antimicrob Agents. 2019 Jun 4. pii: S0924-8579(19)30135-9. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2019.05.018. [Epub ahead of print] (査読あり)
 6. Sato K, Oinuma K, Niki M, Yamagoe S, Miyazaki Y, Asai K, Yamada K, Hirata K, Kaneko Y, Takeya H. 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; 55(7): 713-719 (査読あり)
 7. Yamada K, Namikawa H, Fujimoto H, Nakaie K, Takizawa E, Okada Y, Fujita A, Kawaguchi H, Nakamura Y, Abe J, Kaneko Y, Takeya H. Clinical characteristics of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococcal bacteremia in a tertiary hospital. Intern Med. 2017 ; 56(7) : 781-785. (査読あり)
 8. Namikawa H, Yamada K, Fujimoto H, Oinuma KI, Tochino Y, Takemoto Y, Kaneko Y, Shuto T, Takeya H. Clinical Characteristics of Bacteremia Caused by Extended-spectrum Beta-lactamase-producing Escherichia coli at a Tertiary Hospital. Intern Med. 2017 ; 56(14) : 1807-1815. (査読あり)
 9. Yamada K, Nakaie K, Takizawa E, Namikawa H, Fujimoto H, Okada Y, Fujita A, Nakamura Y, Abe J, Kaneko Y, Takeya H. Clinical and Molecular Characteristics of University Hospital Patients from whom Multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa Strains were isolated. Osaka City Med J. 2017 ; 63:1-8. (査読あり)
 10. Namikawa H, Yamada K, Shibata W, Fujimoto H, Takizawa E, Niki M, Nakaie K, Nakamura Y, Oinuma KI, Niki M, Takemoto Y, Kaneko Y, Shuto T, Takeya H. Clinical Characteristics and Low Susceptibility to Daptomycin in Enterococcus faecium Bacteremia. Tohoku J Exp Med. 2017; 243:211-218. (査読あり)

〔学会発表〕(計8件)

1. 掛屋 弘. 第30回日本臨床微生物学会総会・学術集会(2019/2/1~3)シンポジウム5 真菌感染症の検査:培養から抗原検出・遺伝子診断まで「ムーコル症のトピックス」
2. 掛屋 弘. 第62回日本医真菌学会総会・学術集会(2018/9/10)「菌種別の最近のトピックスと問題点 ムーコル症の最新のトピックスと今後の課題」
3. 柴多 渉、仁木満美子、老沼研一、井本和紀、山入和志、並川浩己、吉井直子、山田康一、金子幸弘、掛屋 弘. 第62回日本医真菌学会総会・学術集(2018/9/9)「protein RSA (Rhizopus-specific antigen) の機能解析」
4. 掛屋 弘. 第41回日本呼吸器内視鏡学(2018/5/24)「深在性真菌症診断における気管支内視鏡を用いた真菌抗原検査とPCRの有用性」.

5. 掛屋 弘. 第 29 回日本臨床微生物学会総会・学術集会 (2018/2/9) 「ムーコル感染症 Up-to-Date」.
6. 掛屋 弘. 第 61 回日本医真菌学会総会・学術集会 (2017/9/30～10/1) シンポジウム 2 深在性真菌症の診断の Fronts 「ムーコル症の血清診断法開発の試み」
7. 掛屋 弘. 第 4 回日本医真菌学会関西支部「深在性真菌症研究会」(2017/3/4) パネルディスカッション「深在性真菌症の検査と診断 適応と限界～画像診断の適応と限界」
8. 掛屋 弘. 第 28 回日本臨床微生物学会総会・学術集会 (2017/1/20～1/22) ランチセッションセミナー 6 「臨床微生物学領域において望まれる深在性真菌症検査」

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/infectioncontrol/index.shtml>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：宮崎義継

ローマ字氏名：MIYAZAKI Yoshitsugu

所属研究機関名：国立感染症研究所

部局名：真菌部

職名：部長

研究者番号(8桁): 00311861

研究分担者氏名：渋谷和俊

ローマ字氏名：SHIBUYA Kazutoshi

所属研究機関名：東邦大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 20196447

研究分担者氏名：金子幸弘

ローマ字氏名：KANEKO Yukihiro

所属研究機関名：大阪市立大学

部局名：大学院医学研究科

職名：教授

研究者番号(8桁): 90469958

(2)研究協力者

研究協力者氏名：仁木満美子

ローマ字氏名：NIKI Mamiko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。