

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461516

研究課題名(和文)新規蛋白抗原を用いた接合菌症の早期診断法および免疫治療法の開発

研究課題名(英文)Development of the diagnostic marker in mucormycosis

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：主に血液疾患に発症するムーコル症の早期診断法開発を目的に原因真菌(Rhizopus oryzae)からシグナルシーケンストラップ法にて得られた未知の候補抗原A(23kDa)を検出するELISAキットの測定条件の最適化後、動物実験モデル感染血清中の抗原Aを測定した。その結果、非感染マウスに比較して感染マウス血清中には抗原Aの抗原価が高い傾向が認められた。

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. However, culture often yields no growth, and histopathological identification of organism with typical of Mucorales is sometimes difficult. Therefore, the reliable new diagnostic tool is expected. Secreted and cell-surface molecules are as target antigens for diagnostic tools. The signal sequence trap (SST) is a strategy to identify signal sequence containing cDNAs that encode secreted and cell-surface proteins. We constructed a SST cDNA library from RNA extraction from the clinical isolate Rhizopus oryzae. The ELISA kit to detect the target antigen was made and evaluated. The antigen A was also detected in R. oryzae infected mice sera. The 23kDa of the hypothetical protein, Antigen A, is a potential novel diagnostic maker in mucormycosis.

研究分野：感染症

キーワード：ムーコル症 早期診断

1. 研究開始当初の背景

ムーコル症は稀な深在性真菌症であるが、血液疾患患者の剖検例では、アスペルギルス症、カンジダ症に次ぐ第3位で、近年その患者数の増加が注目されている。ムーコル症の原因真菌は *Rhizopus*、*Absidia*、*Cunninghamella*、*Rhizomucor* などの属種がある。ムーコル症の診断は、一般に病理組織学的検査や真菌学的検査によってなされるが、基礎疾患の状態が不良で侵襲的な検査が困難な場合も多い。その治療薬はアムホテリシン B 製剤 (D-AMB(アムホテリシン B)) およびアムホテリシン B リポソーム製剤 (L-AMB) とのボサコナゾール(我が国では未発売)のみが有効であるが、その予後は極めて不良であるため初期の治療薬選択が重要となる。

遷延する抗菌薬不応性の発熱性好中球減少症患者でみられる胸部異常陰影では、肺アスペルギルス症や肺ムーコル症などが鑑別として挙げられる。画像所見は非特異的であり、原因を推定することは難しい。そのため血清診断が有用な手段となる。血清診断は、アスペルギルスガラクトマンナン抗原、 α -D-グルカン等が挙げられる。真菌の細胞壁の成分である α -D-グルカンを検出する血清診断検査は、カンジダ血症の診断に有用である。一方、アスペルギルスガラクトマンナン抗原検査は、血液悪性疾患の侵襲性肺アスペルギルス症患者で 80% 程度の感度・特異度が報告されているが、偽陽性要因も多く、血液疾患以外はその感度や特異度が限られる。一方、ムーコル症に特異的な血清診断は実用化していないため、新しい検査法の開発が期待されている。

2. 研究の目的

我々はシグナルシークエンストラップ法を利用し、真菌の診断ツールならびに治療薬候補を応用することが期待される膜蛋白

質および分泌蛋白質を網羅的に同定した後に、新規抗原を選定した。その後モノクローナル抗体を開発して、ムーコル症の早期診断法を確立することを目的に研究開発を試みている。

ムーコル抗原検出キット(ELISA)として、ムーコル症の原因真菌で最も多い *Rhizopus oryzae* (臨床分離株) より得られた未知の蛋白抗原 A 抗原 (23kDa 蛋白) を検出する ELISA キットを作成し、その評価を行った。前年度までの研究で候補 A 抗原は *R. oryzae*、*R. microsporus*、*R. microsporus* var. *rhizopodiformis* 培養上清中およびそれらの感染マウス血清中からも検出されることを明らかとし、新たな抗原検出法となる可能性が示唆されていたが、その感度や特異度が限られていた。そのため 2014 年度は、検出法の条件の改善を行い、ELISA プレートおよびブロッキングバッファー、抗体の希釈濃度を変更することで、候補 A 抗原を検出する感度を改善することに成功した。2015 年度は、マウス感染の検体を使用してキットの再評価を行った。

3. 研究の方法

1) 肺ムーコル感染マウスモデルの作成

7 週齢 ICR マウス (雌) に免疫抑制のためサイクロフォファミド (200mg/kg、腹腔内投与) (200mg/kg、腹腔内投与)、酢酸コルチゾール (250mg/kg、皮下注) を投与し、さらに *Rhizopus oryzae* (TIMM1327 株) を 1×10^4 /mice もしくは 1×10^6 /mice を気管内に接種して感染モデルを作成した。

2) 感染マウス血清中の抗原検査測定

感染 1 (1×10^6 /mice) マウスより得られた血清、感染 2 (1×10^4 /mice) マウスより得られた血清、および非感染マウス (コントロール) 血清中の抗原 A の濃度を測定した。

3)ROC 分析

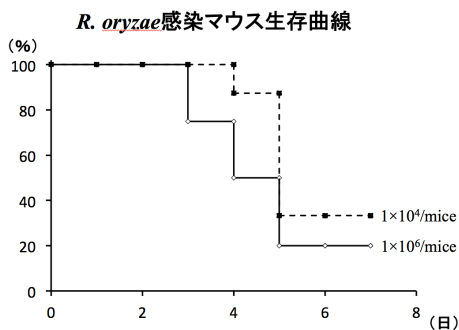
ROC 解析を行い、抗原 A 検出を検出する ELISA 検査の感度および特異度を検討した。

4. 研究成果

1) 感染マウス生存曲線

R. oryzae(TIMM1327 株) 1×10^4 /mice もしくは 1×10^6 /mice を気管内接種した感染マウスの生存率は感染 5 日目以降 20%程度であり、致死性のマウスモデルを作成することに成功した(図 1)。

図 1

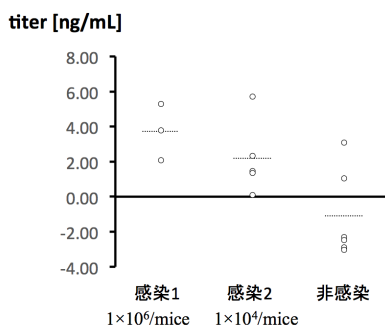


2) 感染マウス血清中の抗原検査

感染 1 (1×10^6 /mice) マウス血清、感染 2 (1×10^4 /mice) マウス血清、および非感染マウス血清中の抗原 A の濃度を ELISA 法にて測定した。その結果、統計学的有意差を検出することは出来なかったが、各群の中央値は、非感染群と比較して、感染 2 および感染 1 では高い傾向が認められた(図 2)。

図 2

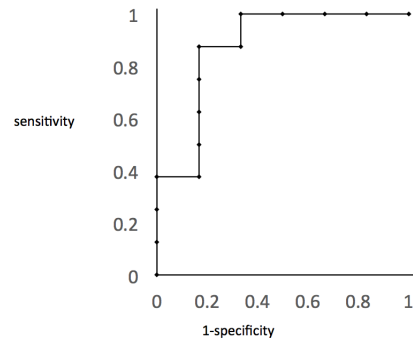
感染マウスおよび非感染マウス血清中の抗原価



3)ROC 分析

検討中の抗原 A 検出 ELISA 検査の感度および特異度を検討するために ROC 分析を実施した。カットオフを約 1ng/mL としたときに、感度および特異度は最大となり、それぞれ 87.5%および 83%であった(図 3)。

図 3



結論: *R. oryzae* の 23kDa 蛋白抗原(抗原 A)を検出する ELISA キットは、*R. oryzae* 感染マウスの補助診断として有用であると考えられた。

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 0 件)
なし

[学会発表](計 1 件)

Takeya Hiroshi, Miyazaki Yoshitsugu, Yamagoe Satoshi, Sato Kaneko, Yamada Koichi, Niki Mamiko, Yukihiro Kaneko, Kohno Shigeru. Identification of 23kDa of Antigen as a Candidate of the Diagnostic Marker in Mucormycosis by *Rhizopus oryzae*. ICAAC/ICC 2015. Poster, サンディエゴ (米国) 2015年9月18日発表

[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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

宮崎 義継 (MIYAZAKI, Yoshitsugu)
国立感染症研究所・真菌部・部長
研究者番号：00311861

(3) 研究分担者

渋谷 和俊 (SHIBUYA, Kazutoshi)
東邦大学・医学部・教授
研究者番号：20196447

(4) 研究分担者

河野 茂 (KOHNO, Shigeru)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・
客員研究員
研究者番号：80136647