

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08958

研究課題名(和文) 特異抗体を用いた深在性真菌症の新規画像診断法の開発

研究課題名(英文) Developing of novel diagnostic imaging using specific antibody of fungus

研究代表者

掛屋 弘 (Hiroshi, Kakeya)

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：深在性真菌症の補助診断には抗原検査が利用されているが、感度や特異度は限られ、新規の検査法開発が期待されている。本研究では真菌(Rhizopus oryzae)由来の特異抗体を用いて、PET/CTにて抗原を検出する特異的画像診断の基礎研究を行った。ムーコル症の代表菌種Rhizopus oryzae由来のRSA抗原に対する特異的モノクローナル抗体を用いて感染マウス肺の菌体を免疫染色および金コロイドを用いた免疫電顕による検出を試みた。その結果、免疫染色では菌体を描出できたが、免疫電顕では菌体を検出できず、特異抗原の局在を特定することができなかった。具体的な画像診断研究へ発展することができなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

深在性真菌症の早期診断のための培養検査の感度は低く、血清診断や遺伝子検査が期待されるが、血液を検体とした抗原検査ではその感度や特異度にも限界が報告されている。癌領域では特異抗体を用いた癌の転移の局在を画像検査にて検出する試みが行われているが、感染症領域においては研究が十分ではない。本研究では、新規の特異抗体を用いて深在性真菌症の画像診断の開発を試みるための基礎研究を行った。本研究の発展は予後不良な深在性真菌症の非侵襲的な診断法の開発につながることを期待される。さらなる適切な抗体の選択が重要と考えられ、研究の継続が必要と考える。

研究成果の概要(英文)：As early diagnosis and early treatment improve the prognosis of mucormycosis, the development of a sensitive early diagnostic method is important. We had previously identified a Rhizopus-specific antigen (RSA) by signal sequence trapping and retrovirus-mediated expression (SST-REX), and evaluated its utility as a diagnostic antigen by constructing a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) system to detect serum RSA levels in inoculated mice. In this study, we used the RSA-specific rabbit monoclonal antibodies to develop of novel diagnostic imaging. As a result, RSA monoclonal antibody can detect R. oryzae in lungs of infected mice by immunohistochemistry methods, but RSA antibody-gold nanoparticles conjugate can not detect fungus by electron microscope. Further examinations are required.

研究分野：感染症

キーワード：深在性真菌症 特異抗体

1. 研究開始当初の背景

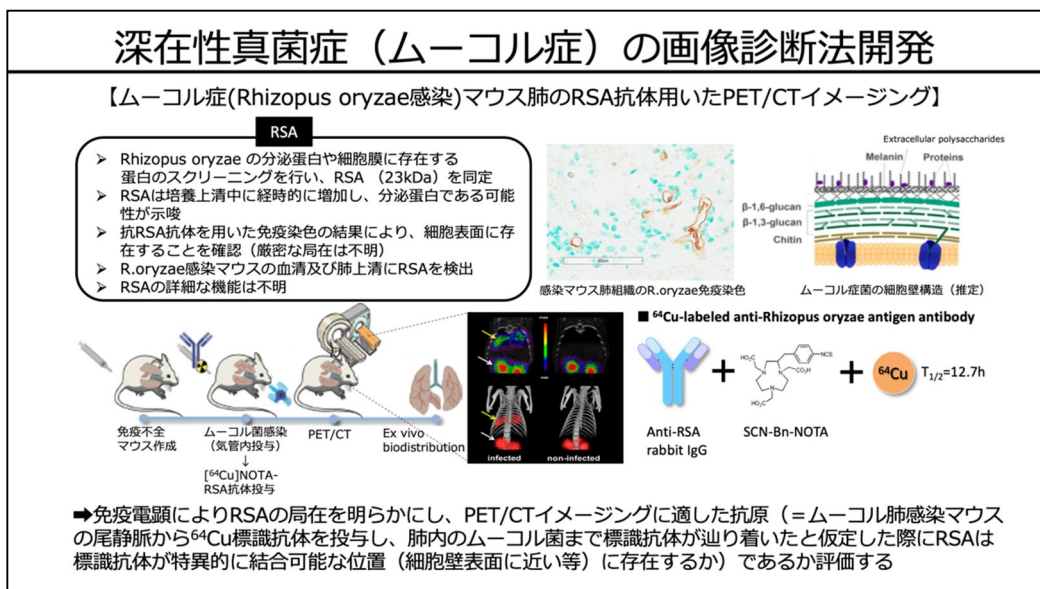
近年の医学の発展によって免疫抑制患者の増加とともに、深在性真菌症が注目されている。血液悪性疾患等の高度免疫不全患者に見られる深在性真菌症の補助診断として、アスペルギルス症では菌体のガラクトマンナン抗原を検出する血清診断検査が利用されているが、その感度や特異度は限られ、新規の検査法の開発が期待されている。また、2番目に多い糸状菌感染症であるムーコル症では実用化されている抗原検査はない。我々は真菌研究において新しいアプローチであるシグナルシーケンストラップ (SST-REX) 法を利用し、真菌の診断ツールならびに治療薬候補を応用することが期待される膜蛋白質および分泌蛋白質を網羅的に同定した後に、モノクローナル抗体を開発して、深在性真菌症の早期診断法を確立することを目標に研究を実施している。現在までに、SST-REX法を用いてアスペルギルス症の代表菌種である *Aspergillus fumigatus* (臨床分離株) (主に国立感染症研究所にて研究を実施)、およびムーコル症の代表菌種 *Rhizopus oryzae* (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 (大阪市立大学にて実施)、未知の数種の蛋白抗原の候補 (アスペルギルス: Y1, B11a, B11b (約 20kDa, 生育および病原性に関与する蛋白)、ムーコル: RSA (23kDa, 未知の蛋白)) が選出された。それらの抗原を精製、ウサギに免疫して抗体を精製、その後 ELISA キットを作成。それぞれの ELISA キットは感染マウスの血清中のそれぞれの抗原検出に成功している。アスペルギルス Y1 抗原およびムーコル RSA 抗原は、それぞれ特許申請を行っている (特許第 5925783 号; アスペルギルスフミガーツス感染症の検査、予防及び治療のための方法並びに組成物 (国立感染症研究所より申請)、特許第 6742611 号; ムーコル症を診断/検査するためのツールおよび方法 (国立感染症研究所および大阪市立大学にて申請))。がん領域においては、がん特異抗体を用いた画像検査の研究が進んでいる。一方、感染性領域においては、その研究は限られている。

2. 研究の目的

本研究では、真菌由来の特異抗原に対する抗体を用いて、PET/CT にて抗原を検出する特異的画像診断の開発を試みる。本研究は、非侵襲的な深在性真菌症の診断に繋がることが期待される。

3. 研究の方法

免疫抑制マウスに経気道的に *A. fumigatus* を感染させ、肺感染モデルを作成。マウスより肺を取り出し、アスペルギルス抗体 (抗 Y1 抗体, 抗 B11a 抗体, 抗 B11b 抗体) を用いた組織の免疫染色を行った。また免疫抑制マウスに経気道的に *R. oryzae* を感染させ、肺感染モデルを作成。マウスより肺を取り出し、RSA モノクローナル抗体を用いた組織の免疫染色や電子顕微鏡による免疫染色にて菌体の描出および RSA の局在の検出を試みた。



4. 研究成果

基礎研究としてアスペルギルス特異抗体 (抗 Y1 抗体, 抗 B11a 抗体, 抗 B11b 抗体) およびムーコル特異抗体 (抗 RSA 抗体) を用いて感染マウス肺組織を用いて免疫染色を実施した。

1. アスペルギルス感染モデルにおける特異抗体による免疫染色

Y1 及び B11a、b、c のいずれのラビット由来抗体がアスペルギルスを染色することを確認できた。加えて、菌の外膜だけでなく菌体内部に顆粒状の染色がいずれの抗体でも確認できた。(図1) 染色像から抗体の反応性としては、Y1 = B11b > B11a > B11c の順に良いと考えられた。

2. ムーコル感染モデルにおける特異抗体による免疫染色および免疫電顕による観察

抗 RSA モノクローナル抗体を用いた組織の免疫染色にて感染マウス肺組織内に菌体を確認することができた(図2)。一方、免疫電顕では RSA の局在を明らかにすることができなかった(結果非表示)。

考察

真菌特異抗原に対する抗体を用いた組織中の免疫染色にてアスペルギルスおよびムーコルを検出することができた。一方、ムーコルに関しては免疫電顕を行ったが RSA の局在を決定できなかった。抗原の局在等を明らかとして、その後に放射性同位物質をラベリングした抗体を感染動物に投与して、画像検査にて検出する研究に発展させる予定であったが、適切な抗体の評価が今後も必要であることが分かり、次のステップへ進展させることができなかった。

現在、深在性真菌症のスクリーニング検査として抗原検査や遺伝子検査が期待されるが、現行のアスペルギルス抗原検査もその感度・特異度は限られており、新たな抗原の模索が続いている。またアスペルギルスの遺伝子検査も基礎研究が多く行われているが、定着と感染を分ける課題が解決されていない。一方、深在性真菌症の中でもムーコル症に関しては、抗原検査等のスクリーニング検査は実用化されておらず、研究の発展が期待されている。深在性真菌症の患者は免疫抑制状態であり、侵襲的な検査を実施することが難しいことが多い。そのため非侵襲的な検査の開発が期待されている。特異抗体を用いた感染症の画像検査は基礎研究の段階であるが、実現すれば多くの深在性真菌症患者の予後を改善する可能性のある研究と考えられ、今後も研究継続が必要と考える。

図 1

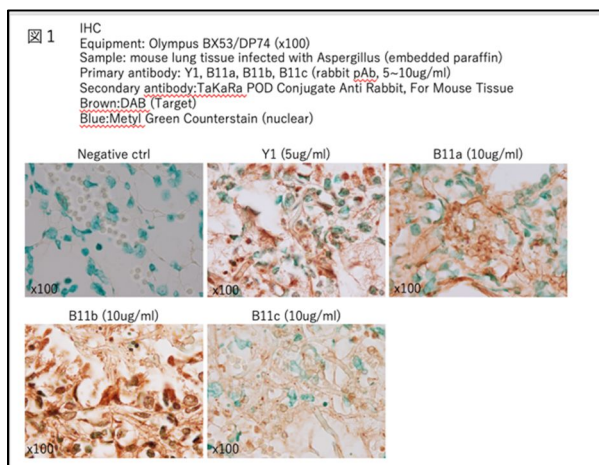
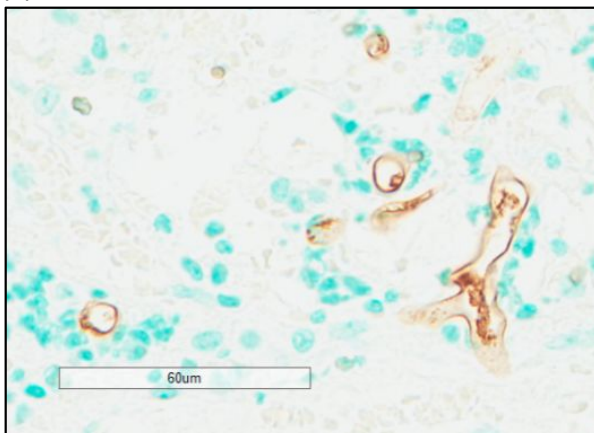


図 2



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 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.	4. 巻 58
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 958-964
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6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 掛屋 弘
2. 発表標題 糸状菌診断のピットフォールと新たな展開 2. 新しい血清診断法
3. 学会等名 第94回日本感染症学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Wataru Shibata, 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 Hiroshi Kakeya
2. 発表標題 Advance in filamentous fungi infections. 「Recent approach to the early diagnosis of mucormycoses
3. 学会等名 The 7th Asia-Pacific Society for Medical Mycology Congress. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 掛屋 弘
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

1. 発表者名 掛屋 弘
2. 発表標題 会長企画：Expertが斬る「掛屋弘がムーコル症を斬る」
3. 学会等名 第36回日本環境感染学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柴多 渉, 掛屋 弘
2. 発表標題 シンポジウム7「ムーコル症 Up-to date」
3. 学会等名 第69回日本化学療法学会西日本支部総会・第91回日本感染症学会西日本地方会学術集会・第64回日本感染症学会中日本地方会学術集会 合同学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪市立大学大学院 医学研究科 臨床感染制御学
http://www.med.osaka-cu.ac.jp/infectioncontrol/research_achievements/index.shtml

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
研究分担者	宮崎 義継 (Miyazaki Yoshitsugu) (00311861)	国立感染症研究所・真菌部・部長 (82603)	
研究分担者	金山 洋介 (Kanayama Yoshuke) (60435641)	国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・研究員 (82401)	
研究分担者	金子 幸弘 (Kaneko Yukihiro) (90469958)	大阪市立大学・大学院医学研究科・教授 (24402)	

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