

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月17日現在

機関番号：13401
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659221
 研究課題名（和文）深在性真菌症・細菌感染症の画像診断のための分子イメージング剤の開発
 研究課題名（英文）Development of the molecular imaging agent for the diagnostic imaging of a deep mycosis and a bacterial infectious disease
 研究代表者
 法木 左近（NORIKI SAKON）
 福井大学・医学部・准教授
 研究者番号：30228374

研究成果の概要（和文）：

真菌・細菌に特異的に取り込まれる分子イメージング剤として、N-[18F] Fluoroacetyl-D-glucosamine (18F-GlcNAc: FAG) を合成した。

細菌感染ラットと非感染性炎症ラットとに FAG-PET 撮影を行うことにより、生体内の感染巣を特異的に画像化できることを証明した。

また、感染ラットに抗生物質を投与し、経時的に FAG-PET 撮影を行うことにより治療効果を画像的に確認できた。

さらに、FAG 合成のための先駆物質を新たに二種類合成し、FAG の収率が改善できた。

研究成果の概要（英文）：

We synthesized N-[18F]Fluoroacetyl-D- glucosamine (18F-GlcNAc: FAG), As a molecular imaging agent specifically taken into the fungus and bacteria.

We proved that we can specifically image the infection nest in the living body by FAG-PET for the rats with bacterial infection and noninfectious inflammation.

Moreover, we confirmed the curative effects of antibiotic by time-dependent changes of FAG-PET images of the infection rat medicated with the antibiotic.

Furthermore, I newly compounded two kinds of precursor for FAG synthesis, and have improved yield of FAG.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：診断

1. 研究開始当初の背景

感染症は今なお死因の多くを占め、社会的にも重要な疾患である。しかし、現在の感染症に対する画像診断法は、単純X線写真、CT、MRI などいずれも、感染に伴う炎症巣の広がりを検出するものである。従って、炎症が大きくなると診断できないなど問題があり、感染症に対する新たな画像診断方法が求められている。

申請者は、いままでの病理解剖の経験から、深在性真菌症診断の困難さや、感染巣の局在診断の難しさを実感し、表在性真菌症の新しい診断方法の研究をしてきた経験から、病原菌を直接、分子イメージングできないかと考えた。そして、真菌・細菌の細胞壁の構成成分である N-acetyl-D-glucosamine(GlcNAc) に注目し、検討した。トリチウム(3H)で標識された 3H-GlcNAc を用いたオートラジオグ

ラフィー実験の結果から、³H-GlcNAc は選択的に真菌に取り込まれることを見出した(2頁の図参照)。³Hを¹⁸Fに置換することにより、PETでの利用が可能となると考えられ、Tada等の方法(1989年)を改変し、¹⁸F-GlcNAc (FAG)の試作品を合成した。これを用いた予備的実験で、大腸菌による大腿部膿瘍を画像化に成功した

2. 研究の目的

本研究の目的は、真菌・細菌に対する分子標的技術を用いて、生体内の感染巣をPET(Positron Emission Tomography)により画像化(イメージング)することである。そのため、真菌・細菌に特異的に取り込まれる分子イメージング剤を開発する。この分子イメージング剤として、N-[¹⁸F]Fluoroacetyl-D-glucosamine (18F-GlcNAc : FAG)を考えている。このFAGにより、真菌や細菌を感染させたラットをPET撮影することにより、感染巣を画像化できるかを検討とする。将来的には、FAGを用いたヒトの感染症診断への臨床応用を目標としている。

3. 研究の方法

本研究の目的達成のために、まず、生体内の病原菌の分子イメージング剤としての¹⁸F-GlcNAc (FAG)の合成を行う。一方、感染動物モデルを作製し、FAGを投与し、PETを用いて、感染巣をイメージングできるか、否か検討する。撮影後は、動物を剖検することにより病理組織学的に検討する。さらに、FAGの投与量や撮影までの時間を変えることにより、至適投与量や適切なUptake timeを決定する。³H-GlcNAcを用いて、多種類の真菌や細菌において、取りこみの差がないかどうか検討する。また、細菌の菌数(菌量)がどのくらいで画像化できるのか、まずin vitroで検討する。これを踏まえて、感染マウスに対して抗生物質を投与し治療過程のPET撮影を行い、感染巣のSUVの変化を経時的に検討する。

4. 研究成果

生体内の感染巣をPET(Positron Emission Tomography)により画像化(イメージング)するため、真菌・細菌に特異的に取り込まれる分子イメージング剤として、N-[¹⁸F]Fluoroacetyl-D-glucosamine (18F-GlcNAc : FAG)を合成した。このFAGにより、細菌を感染させたラットをPET撮影することにより、感染巣を画像化できるかを検討した。

具体的には、ラットの右肩に大腸菌を接種し、感染ラットを作製した。コントロールとして左肩にテレピン油を接種し、非感染性の炎症巣を起した。この同一ラットに対して、FDGとFAGとを一日あけて撮影した。その結果、FDGは両方に取り込まれたが、FAGは感染巣に取り込まれ、FAGは感染巣に特異的であっ

た。これらの結果は、Nucl Med Biol 2011; 38(6):807-17.に発表した。

また、感染ラットに対して、抗生物質を投与し治療過程のPET撮影を行い、感染巣のstandardized uptake values (SUV)の変化を経時的に検討することを試みた。具体的には、大腸菌の混濁液をSD系ラット20匹の右肩部に接種し、接種後4日後に生存している5匹(Nos. 111, 114, 115, 116, 104)に[¹⁸F]-FAGを尾静脈より投与し、PET撮影を行った。撮影後、カルバペネム系抗生物質であるメロペンを120mg/Kg/Dayを2分割にて腹腔内投与を行った。接種後6日目までに生存していた3匹(Nos. 111, 115, 104)と抗生物質非治療で生存している1匹(No. 109)に、[¹⁸F]-FAGを尾静脈より投与し、PET撮影を行った。さらに、接種後10日目に生存している3匹(Nos. 115, 104, 109)に対して[¹⁸F]-FAGを尾静脈より投与し、PET撮影を行った。

当初の予定では、ブドウ球菌や緑膿菌による感染モデルに用いて行う予定であったが、治療効果を見るほど生存ができず、従来の大腸菌を用いることとした。しかし、抗生物質感受性菌であり、治療に反応して、経時的に同一個体での感染巣の[¹⁸F]-FAG-PET画像を撮影することができた。

接種後10日目(治療開始後6日目)の3回目の撮影後、エーテル麻酔により屠殺後、剖検により感染部位の病理組織標本を作製し、感染巣の状態を組織学的に検討した。

感染巣における[¹⁸F]FAGの取りこみはDr. View Software, version 2.0.0.を用いて定量化した。平均値を用いて、全ての関心領域(感染巣)はstandardized uptake values (SUV)に変換された。SUVは次ぎの式から求められる:

$$SUV = \frac{[\text{tissue activity concentration}]}{([\text{injection dose}] / [\text{body weight}])}$$

感染巣および、非感染巣(対側である左肩部)でのSUV値をTable 1.にまとめた。また、感染部のSUV値の変化のグラフをFig.1に示す;

Rat #	PET Day=0		PET Day=2		PET Day=10	
	SUV/gm/L	SD	SUV/gm/L	SD	SUV/gm/L	SD
Rat 111 IM	0.42	0.00	0.41	0.02		
Rat 113 NM	0.10	0.01	0.11	0.01		
Rat 114 IM	0.48	0.02				
Rat 114 NM	0.13	0.00				
Rat 115 IM	0.44	0.01	0.44	0.02	0.39	0.01
Rat 115 NM	0.13	0.01	0.15	0.01	0.16	0.01
Rat 116 IM	0.45	0.02				
Rat 116 NM	0.15	0.01				
Rat 104 IM	0.13	0.00	0.17	0.00	0.08	0.01
Rat 104 NM	0.04	0.00	0.14	0.01	0.10	0.01
Rat 109 IM*	0.47	0.01	0.45	0.01	0.18	0.01
Rat 109 NM*			0.15	0.01	0.21	0.01

IM: infected muscle
NM: non infected muscle
* Rat 109 was not subjected to antibiotic treatment.

Table 1. 感染領域と非感染領域における [18F]FAG の SUV 値

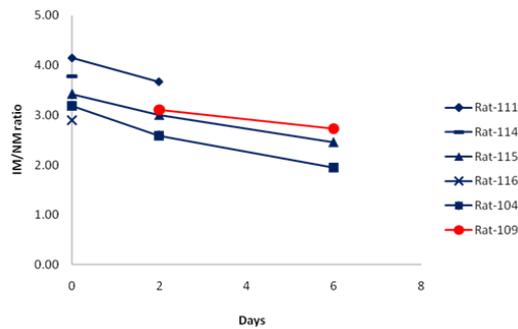


Fig. 1. 抗生物質治療群 (Nos. 111, 114, 115, 116, 104) と非治療ラット (No. 109) における、感染領域 (筋肉) (IM) と非感染領域 (筋肉) (NM) の比 (ROI) の経時変化

非感染領域と感染領域との比を、抗生物質治療群と非治療ラットとを比べたグラフを示す; Fig. 2. また、 $[^{18}\text{F}]$ FAG の蓄積が、大腸菌を接種した右肩部に認められることを示す PET 画像を提示する; Fig. 3. 治療群の方が非治療群より SUV 値の低下が著明であり、このことは $[^{18}\text{F}]$ FAG を取りこむ菌の減少を反映している。すなわち、抗生物質の効果は FAG-PET の画像から定量化できることを示すものである。さらに多くのラットを用いる必要があるが、我々の当初の予定は達成できたと考えられる。また、接種後 10 日目 (治療開始後 6 日目) の 3 回目の撮影後、剖検時の右肩部 (感染部) と左肩部 (非感染部) の写真を示す; Fig. 4

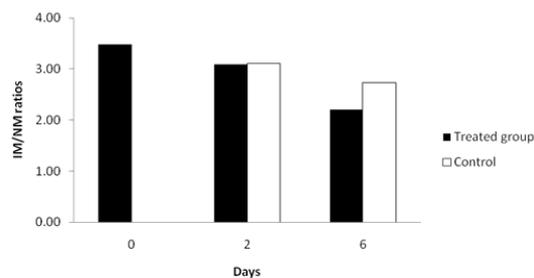


Fig. 2. 抗生物質治療の効果。抗生物質治療群と非治療ラット (No. 109) との ROI の平均のグラフ

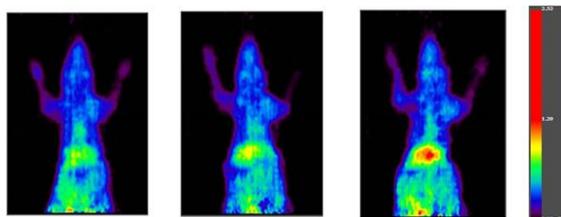


Fig. 3. $[^{18}\text{F}]$ FAG (16.1-19.2 MBq) の静注後、60 分後の FAG-PET 画像。いずれのラットも右肩部の感染部位は対照である左肩部の非感染部位に比して、 $[^{18}\text{F}]$ FAG の取りこみ像が認められる。



Fig. 4. No. 115 ラットの剖検時の両側肩部の背部からの肉眼像 (中)。左肩部 (左)。右肩部 (右)、感染巣が分かる (矢印)。

接種後 10 日目 (治療開始後 6 日目) の 3 回目の撮影後、剖検により得られた右肩部の固定後の肉眼像と組織像とを示す; Fig. 5&6.



Fig. 5 No. 115 ラットの左肩部 (対照) (左側) と右肩部 (感染部) (右側) 矢印は右肩部の感染巣 (膿瘍)

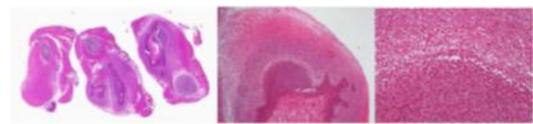


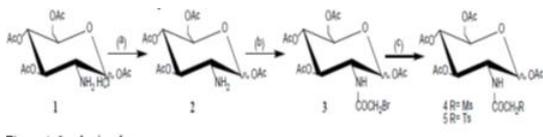
Fig. 6 No. 115 ラットの右肩部 (感染部) のルーペ像 (左)、弱拡大像 (中)、中拡大像 (右)

抗生物質治療により、右肩部に $[^{18}\text{F}]$ FAG の取りこみは減少しており、治療効果を反映していると考えられた。このことは、FAG-PET により種々の抗生物質間の治療効果の検討などにも利用可能と考えられる。

しかし、接種後 10 日目 (治療開始後 6 日目) の 3 回目の撮影時において、右肩部に $[^{18}\text{F}]$ FAG の取りこみが認められており、完治はしていない (菌の残存している) ことが疑われた。剖検により、同部位には、膿瘍が認められた。膿瘍の治療にはドレナージが必要であり、この FAG-PET の画像でも完治はしていないことが示された。このことより、FAG-PET は治療の終了時の判定などにも有効であると思われた。

さらに、研究中、FAG の合成収率が悪いことが問題となっており、収率の改善を図るために、新たに FAG 合成のための先駆物質を二種

類合成した(下図)。これにより FAG の収率が改善でき、FAG-PET の利用が容易になると考えられる。この成果は、平成 25 年 5 月に韓国で開催された第 20 回国際放射線医薬品化学シンポジウムにて発表した。



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 2 件)

① Martínez ME, Kiyono Y, Noriki S, Inai K, Mandap KS, Kobayashi M, Mori T, Tokunaga Y, Tiwari VN, Okazawa H, Fujibayashi Y, Ido T.

New radiosynthesis of 2-deoxy-2-[¹⁸F]fluoro acetamido-D-glucopyranose and its evaluation as a bacterial infections imaging agent.

Nucl Med Biol.

807-17. **38**(6). 2011

査読：あり

DOI: [org/10.1016/j.nucmedbio.2011.02.006](https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2011.02.006)

② 法木左近、稲井邦博、清野泰、Miguel E Martinez、藤林靖久、井戸達雄
感染症診断のための分子イメージング剤の開発

映像情報メディカル

734-736. **43**(9) 2011

査読：なし

<http://www.de-hon.ne.jp/digital/bin/product.asp?sku=2000003262547701500P>

[学会発表] (計 3 件)

① 病理形態学的なアプローチによる感染症診断分子イメージング剤の開発

第 102 回日本病理学会 2013 年 6 月 7 日

法木左近、稲井邦博、Miguel E Martinez、清野泰

② New precursor for radiosynthesis of 2-deoxy-2-[¹⁸F]fluoroacetamido-D-glucopyranose.

The 20th International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences 2013 年 5 月 12 日

M E Martinez, Y Tokunaga, T Mori, S Noriki, K Inai, T Ido, H Okazawa, Y Kiyono.

③ PET による深在性真菌症診断のための分子イメージング剤の開発

日本医真菌学会 2011 年 10 月 22 日

法木左近、岩崎博道

6. 研究組織

(1) 研究代表者

法木 左近 (NORIKI SAKON)

福井大学・医学部・准教授

研究者番号：30228374

(3) 連携研究者

稲井 邦博 (INAI KUNIHIRO)

福井大学・医学部・助教

研究者番号：30313745

清野 泰 (KIYONO YASUSHI)

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：50305603

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