

質量分析を用いた結核病巣の可視化

結核研究所生体防御部免疫科

科長 瀬戸 真太郎

質量分析イメージング (mass spectrometry imaging) と呼ばれる、生体試料における分子の分布を、質量分析計を用いて明らかにする方法が開発されている。近年、マウス、ウサギなどの実験動物やヒト結核患者からの手術検体を利用して、本法によって結核病巣における抗結核薬の分布を明らかにする報告が海外の研究者からなされている。抗結核薬がどのように結核病巣に浸透しているかを「視る」ことができるため、結核研究の進展に貢献している。本稿では、この質量分析を用いた結核病巣の可視化について解説する。

質量分析とは？

質量分析 (mass spectrometry, MS) とは、試料中の分子をイオン化し、イオンの質量と電荷に基づいて m/z (エム・オーバー・ジーと読む) を検出する分析法である。質量分析によって、横軸に m/z 、縦軸に検出強度をともなったマススペクトルと呼ばれる結果を得ることができる。試料中に含まれる分子の構造に関係する情報を得ることができるため、質量分析は既知物質の同定や新規物質の構造決定に利用されている。質量分析を行うためには、試料をイオン化する必要がある。イオン化されにくい分子をイオン化するためにエレクトロスプレーイオン化法 (electrospray ionization, ESI) や、マトリクス支援レーザー脱離イオン化法 (matrix-associated laser desorption ionization, MALDI) が開発されている。MALDI法を開発した島津製作所の田中耕一氏に対して、2001年にノーベル化学賞が授与されている。MALDI法は、様々な分子をイオン化するために最適化されたマトリクスが開発されていること、微量の試料から分析できること、試料の純度に対する要求性が低いことなどの理由で、大量の高純度試料を準備することが難しい生体由来試料の分析を容易にしている。

質量分析イメージングの原理

質量分析イメージングの原理を図1に示す。実験動物から採取した臓器、組織や患者から採取した生検や手術切除検体などの生体試料を凍結して、切片化する。測定対象分子の検出に適したマトリクスを選択して、切片化した標本上に塗布する。標本を質量分析イメージング装置 (一般的なMALDI-MS装置と専用ソフトウェアでも解析できる) で解析を行う。走査型電子顕微鏡のようにレーザーを標本全体を照射することによって、すべての位置におけるマススペクトルを取得する。マススペクトルから標的分子の m/z の検出強度を選択して、標本上における目的分子の分布を可視化する。可視化の標的となる分子は、ペプチド、タンパク質、脂質、糖、薬剤など非常に多彩である。開発当初は分解能が0.1-1 mm程度であったが、現在では、レーザー収束技術と装置制御能の技術革新によって10 μm まで向上している。

結核病巣における抗結核薬の可視化

結核病巣における抗結核薬の質量分析イメージングの報告は、2011年にPrideauxらによってなされた (Anal Chem 2011 83:2112-2118)。Prideauxらはウサギに結核菌を感染させて、ヒト結核でも見られる乾酪壊

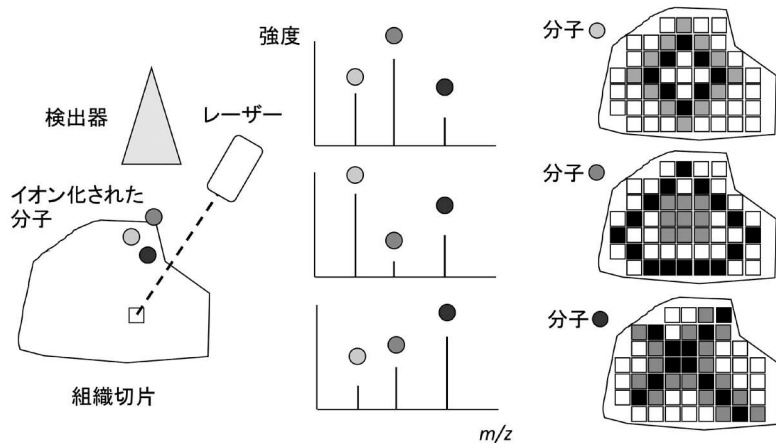


図1. 組織切片すべてのエリアをレーザーでスキャンして、マススペクトルを取得する特定の分子の m/z のみを抽出して、その強度で組織切片における分布を画像化する

死を伴う肉芽腫など、様々なタイプの肉芽腫を形成させた。ウサギを含む動物モデルの結核研究における有効性については、本誌No. 394「世界の結核研究の動向(19)」にて解説されている。結核菌を感染させたウサギにモキシフロキサシン (MXF) およびレボフロキサシン (LFX) を投与した。ウサギを安楽死させ、感染肺を取り出し、組織に含まれる結核菌をガンマ線照射で殺菌した後、質量分析イメージングを行った。薬剤は肺全体に均等に分布しているのではなく、特に感染によって生じた肉芽腫病巣に蓄積していることが明らかになった。また、病巣内でも均等には分布していなかった。細胞性の肉芽腫病巣に比べて、乾酪壊死への浸透が悪かった。MXF、LFXなどのフロロキノロン系抗菌薬はイソニアジド (INH)、リファンピシン (RIF) が使用できない多剤耐性結核の治療に最も重要な抗菌薬であると位置づけられている。試験管内での実験でも、非常に高い殺菌活性を示すことや、生体内での結核菌の増殖の場であるマクロファージへの浸透性やマクロファージに感染している結核菌への殺菌活性も高いことが明らかになっている。しかし、ヒト結核におけるMXFの効果は前臨床研究結果よりも劣ること、治療期間短縮には貢献しないことなども以前は報告されていた。

また、Prideauxらはヒト結核病巣における抗結核薬の可視化も行っている (Nat Med 2015 21:1223-1227)。薬剤耐性結核のために肺切除手術を受ける患者に、手術前にINH、RIF、ピラジナミド (PZA)、MXFを1回投与し、切除肺の質量分析イメージングを行った。INH、PZAは速やかに乾酪壊死の中心部まで浸透していた。対照的にMXFはウサギ結核と同様に乾酪壊死への浸透が悪いことが示された。次に、手術数か月前から抗結核薬を投与している患者の切除肺で質量分析イメージングを行った。非常に興味深いことに、INH、RIF、PZAは乾酪壊死に蓄積していることが明らかになった。特にRIFは、細胞性肉芽腫と比べても10倍以上、1回投与に比べて20倍以上、乾酪壊死に蓄積していた。このことは、結核患者におけるRIFの殺菌効果が非常に高いことを説明している。さらに、クロファジミン (CFZ) の結核病巣における分布も明

らかにしている。ハンセン病治療薬であるCFZは現在、多剤耐性結核の治療薬として使用されている。マウスを用いた研究では、CFZは単剤で使用した場合、Balb/cでは有効性を示すが、C3HeB/FeJでは弱い殺菌効果しか示さなかった。それは、Balb/cマウスでの結核病巣は細胞性の肉芽腫であるのに対し、C3HeB/FeJはヒト結核と同様の乾酪壊死を伴う肉芽腫を形成するためであると言われていた。質量分析イメージングによって、CFZはヒト結核の乾酪壊死にはあまり浸透しないことが示された。

以上の報告では、MXFやCFZは乾酪壊死への浸透がよくないことが示されている。しかし、国際的にはMXFは現在主流の多剤耐性結核の短期治療レジメンにおけるコアドラッグとして設定されている。また、CFZも国際的な多剤耐性結核治療レジメンにおいて最もよく使用される薬剤である。このことから、他の薬剤との組み合わせや服薬期間によって、両薬剤の乾酪壊死への浸透が変化することが考えられる。両薬剤を使用した現在主流の治療レジメンで、結核病巣への浸透を質量分析イメージングで解析することによって、両薬剤の結核治療における貢献をさらに評価できるのではないかと考えられる。

今後の展望

これまで、質量分析イメージングによる結核病巣の可視化は主に抗結核薬の分布を明らかにするために使用されてきた。質量分析イメージング技術の進歩により、抗菌薬などの低分子だけでなく、ペプチド、タンパク質などの高分子の分布も解析できる。私たちの研究グループは複十字病院との共同研究を行い、多剤耐性結核や肺MAC症患者の切除肺病理標本を用いて、レーザーマイクロダイセクション法とプロテオミクスを組み合わせて、抗酸菌症肉芽腫に含まれるタンパク質を網羅的に同定することができた (Front Microbiol 2020 10:3081)。質量分析イメージングを導入することによって、より詳細なタンパク質分布マップの構築を行うことができる。その成果が、多剤耐性結核などの難治性結核における免疫治療法や宿主タンパク質を標的とした化学療法の開発につながることを期待している。🐾