

1704 細菌感染症早期画像診断を目指した標識アミノ酸の集積と 細菌増殖活性の関連性評価

藤居 紗暉子

(指導教員：川井 恵一 教授)

要旨：細菌感染症の診断法として一般的に用いられている細菌培養法は、侵襲的であり、検査結果の判定までに長時間を有するため、症状の進行が急激かつ重篤で死亡率も高い劇症型感染症等の診断法として不十分である。そこで本研究では、細菌感染症発症前の早期診断を可能にするため、天然標識アミノ酸及びグルコース誘導体の集積と細菌の増殖活性の関連性評価を行った。高い安全性を有する大腸菌 K-12 株を用い、 $^3\text{H-L-tyrosine}$ 、 $^3\text{H-L-histidine}$ 、 $^3\text{H-L-methionine}$ 及び $^{18}\text{F-FDG}$ と同じ集積機序を示すグルコース誘導体 $^3\text{H-2DG}$ の大腸菌増殖開始からの経時的集積と大腸菌の増殖活性の関連性を評価した。その結果、 $^3\text{H-L-tyrosine}$ 、 $^3\text{H-L-methionine}$ では細菌増殖開始後の対数増殖期で、 $^3\text{H-L-histidine}$ 、 $^3\text{H-2DG}$ では対数増殖期後の定常期で高い集積が確認された。一方、放射性ヨウ素標識アミノ酸 $^{125}\text{I-L-tyrosine}$ と $^{125}\text{I-L-histidine}$ は、標識天然アミノ酸と比較して非常に低い集積になった。以上より、細菌の増殖活性が急速に増強する対数増殖期を反映した集積を示す天然アミノ酸 L-tyrosine や L-methionine を基本骨格とする標識アミノ酸が細菌感染症の早期画像診断には有用と考えられ、その中でもすでに臨床で利用されている標識アミノ酸[S-methyl- ^{11}C]-L-methionine などを用いた細菌感染症早期画像診断の可能性が示された。

I. はじめに

現在の細菌感染症の検査方法は細菌培養法が用いられている。しかし、この方法は検体を採取するため侵襲的で、検査の判定までに時間がかかるため、症状の進行が急激かつ重篤で死亡率が高い劇症型感染症^{1,2)}などの診断には適さない。そこで、本研究では細菌感染症の原因細菌が体内へ侵入して感染し、体内で細菌の増殖活性が増強し、発症するまでの感染症発症の流れの中で、現在、診断が行われている発症後よりも早期の、細菌の増殖活性が増強する発症前での細菌感染症早期画像診断を目指した。本研究では Fig.1 に示す細菌の増殖曲線を細菌の増殖活性を確認する指標として用いた。細菌の増殖における誘導期、対数増殖期、定常期の3段階の中でも、特に急速に細菌の増殖活性が増強する対数増殖期が細菌感染症早期画像診断に適すると考えて、放射性トレーサーの集積と細菌増殖活性の関連性の評価を行った。放射性トレーサーとしては、現在がん診断に用いられ、感染症画像診断の可能性が示されている $^{18}\text{F-FDG}$ ^{3,4)} と集積機序が同じであるグルコース誘導体[1,2- ^3H]-2-deoxy-D-glucose (2DG) 及び、 $^{18}\text{F-FDG}$ に代わる薬剤として注目されている標識アミノ酸に着目した。現在すでに D 体アミノ酸を用いた感染症画像診断の可能性が示されているが⁵⁾、本研究では L 体のアミノ酸が蛋白合成などのため細菌に取り込まれる⁶⁾ことに注目し、その集積が細菌の増殖活性にも関連することを期待し、L 体アミノ酸の集積と細菌増殖活性の関連性を評価した。標識アミノ酸には、すでに臨床で脳腫瘍の PET 診断に用いられている L-methionine、ヨウ素標識が可能で SPECT への応用が考えられる L-tyrosine、L-histidine を用いた。

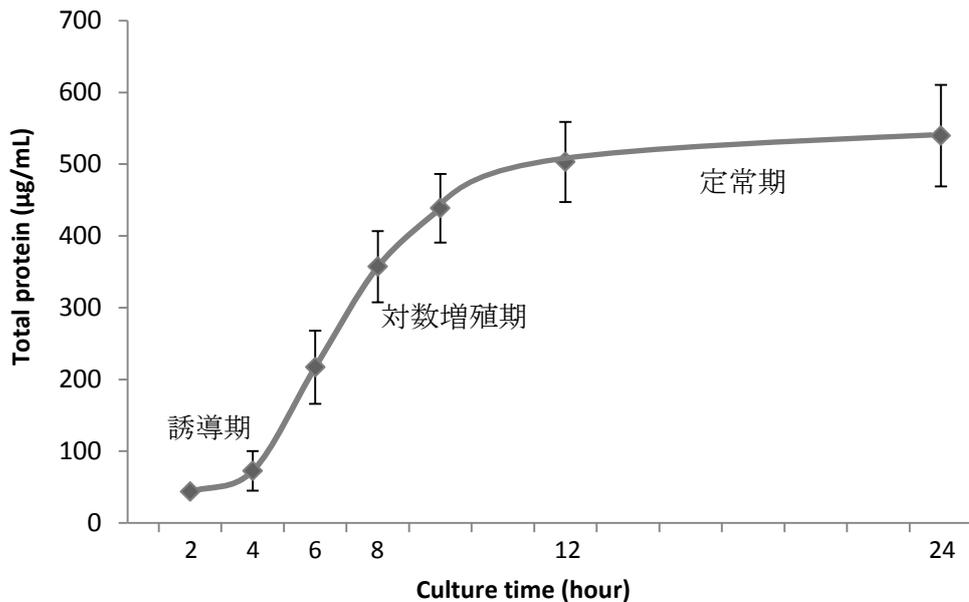


Fig.1 増殖曲線

II. 標識アミノ酸とグルコース誘導体を用いた大腸菌 K-12 株への経時的集積実験

A) 実験方法

放射性トレーサーには ^1H を ^3H に置換した、天然アミノ酸の [ring 3,5- ^3H]-L-tyrosine (tyrosine), [ring 2,5- ^3H]-L-histidine (histidine), [S-methyl- ^3H]-L-methionine (methionine), chloramine-T 法により放射性ヨウ素 ^{125}I を導入した人工アミノ酸 [3- ^{125}I]-L-tyrosine (^{125}I -tyrosine), [5- ^{125}I]-L-histidine (^{125}I -histidine) を用い、天然アミノ酸と人工アミノ酸で細菌への集積の確認を行った。モデル細菌には安全性の高い大腸菌 K-12 株を用いた。上記の大腸菌を 37°C , $5\%\text{CO}_2$ で 12 時間以上培養し実験を行った。測定用培地としてアミノ酸不含有の D-MEM (Dulbecco's modified eagle's medium, Wako) 5 mL に菌液を 200 μL 加え、160 rpm, 37°C で振盪培養し、誘導期 (培養開始後 2h, 4h)、対数増殖期 (培養開始後 6h, 8h)、定常期 (培養開始後 12h, 24h) に標識アミノ酸、グルコース誘導体を 37 kBq 投与し、 37°C の湯浴中で穏やかに振盪しながら、5 分間取り込ませた。その後、6000 G, 4°C で 6 分間遠心分離した。遠心分離後、上清を除去し、ペレットをほぐしたところに PBS (phosphate buffered saline (pH 7.0), Takara) を 5 mL 加えて、遠心分離を 3 回行い、洗浄した。洗浄終了後、上清を除去し、ペレットをほぐし 0.1 M NaOH を 1 mL 加えて、大腸菌を溶解し、大腸菌に集積した放射能を測定した。蛋白組み込み率の測定は、0.1 M NaOH を 1 mL 加えた後、500 mL 分取し大腸菌に集積した放射能を測定し、残った菌液から 190 μL を 1.5 mL エッペンチューブに分取し、最終濃度 5% となるように氷冷 100% トリクロロ酢酸を 10 μL 加え、全量グラスフィルター (GC-50, Advantec) に捕集し、空チューブに氷冷 5% トリクロロ酢酸となるように PBS で調整したものを 1 mL 加えて、その溶液も全量フィルターに加え 3 回洗浄した。フィルターを乾燥機で加温して蛋白をフィルターに固定し、蛋白に組み込みこまれた放射能を測定した。

B) 結果と考察

Fig.2に示すように ^3H -2DGと ^3H 標識天然アミノ酸の大腸菌への集積のうち、tyrosineとmethionineの集積は対数増殖期を反映し、histidineと2DGの集積は定常期を反映していることが明らかとなった。誘導期にはすべての放射性トレーサーで低い集積となり、tyrosineでは最も菌数が多い定常期で最も菌数が少ない誘導期と同程度の集積となった。一方、 ^{125}I -tyrosine、 ^{125}I -histidineではFig.3に示すように非常に低い集積で、大腸菌の増殖活性との関連性は見られなかったことから、感染症早期画像診断には対数増殖期を反映する天然アミノ酸のL-tyrosineやL-methionineを基本骨格とし、構造を変化させない核種で標識したアミノ酸が有用であると考えられた。中でも、現在すでに臨床利用されている[S-methyl- ^{11}C]-L-methionineによる細菌感染症早期画像診断の可能性が示された。また、Fig.4より大腸菌への集積が最も高くなる際に蛋白組み込みも多く、大腸菌の代謝が活性化していることも確認され、大腸菌の増殖に伴う蛋白合成などの代謝の活性が天然アミノ酸の集積に関係していると考えられた。

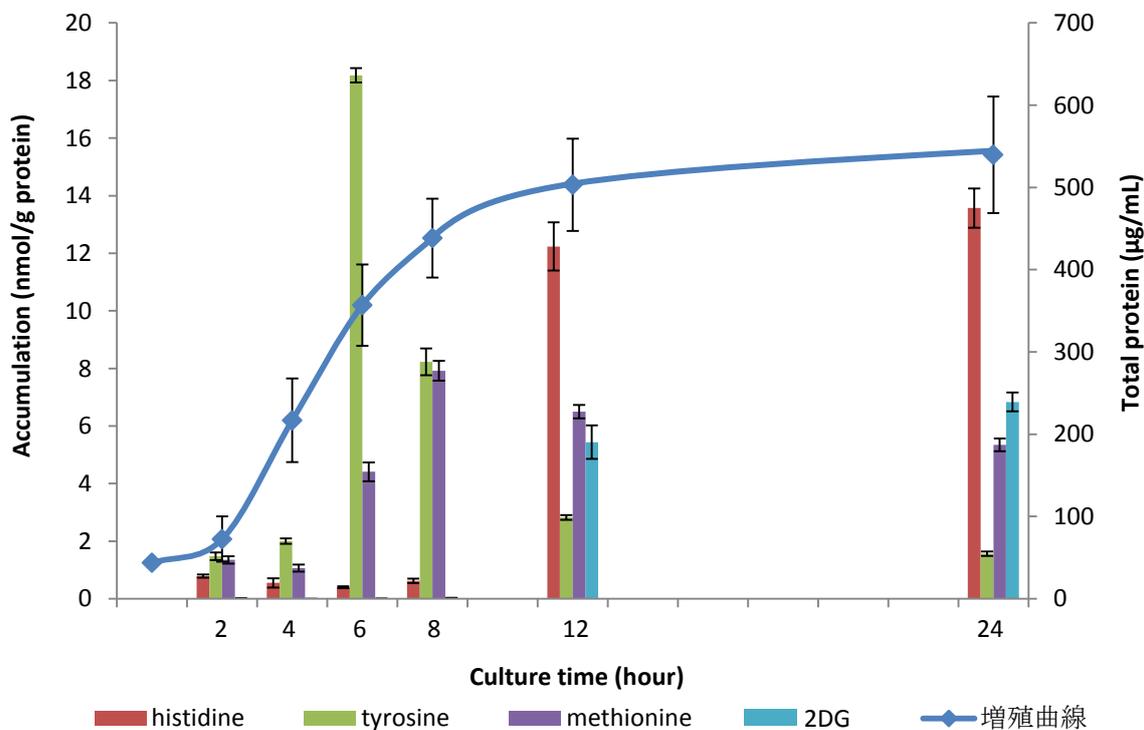


Fig.2 ^3H 標識天然アミノ酸と 2DG の集積

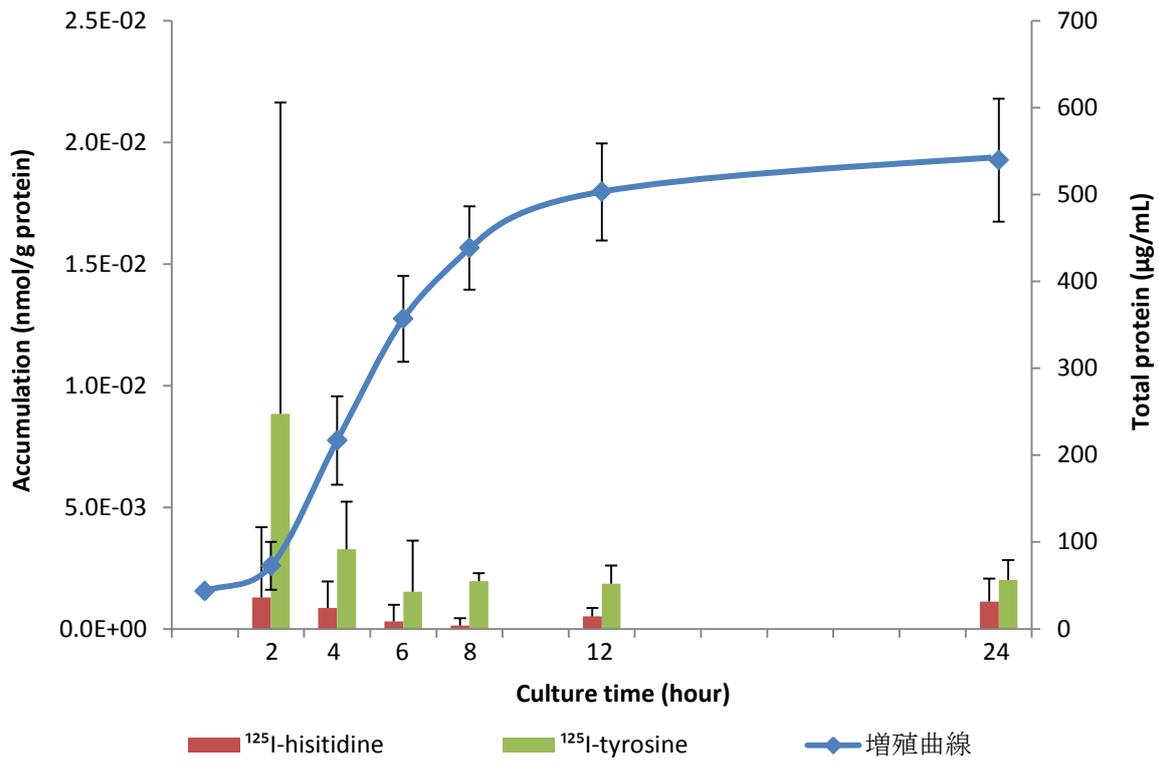


Fig.3 ¹²⁵I 標識アミノ酸の集積

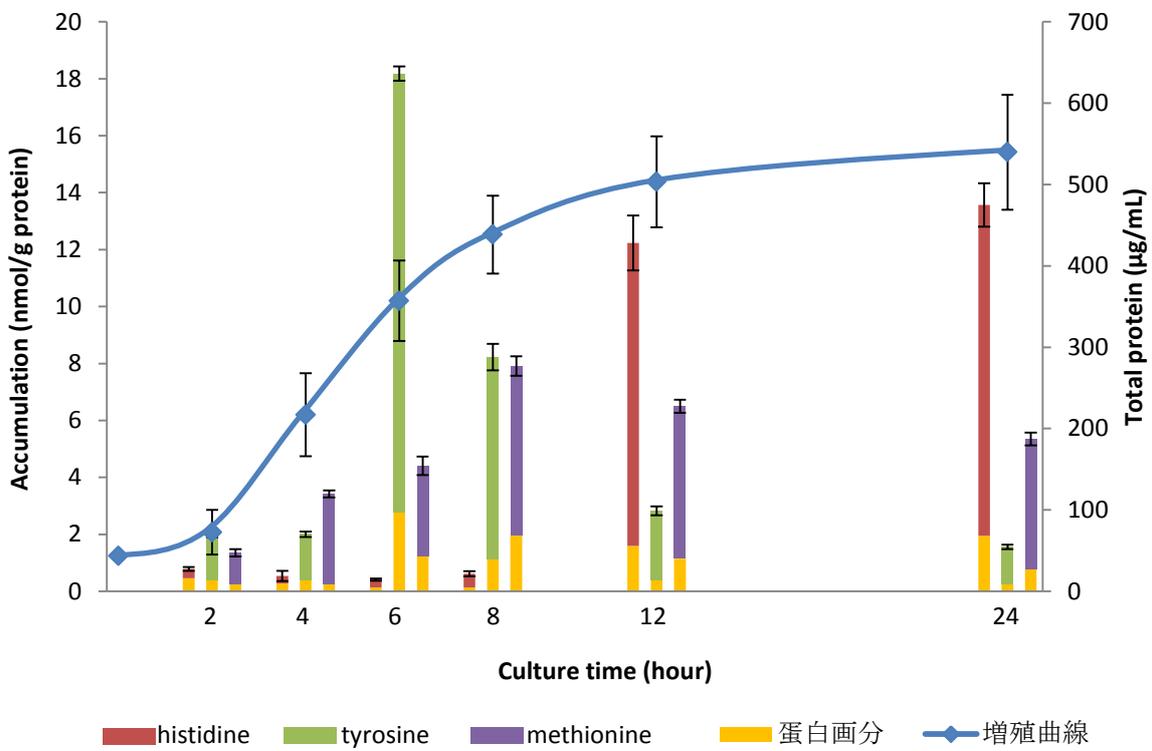


Fig.4 ³H 標識天然アミノ酸蛋白組み込み率

III. 低温培養による大腸菌への集積確認実験

ここで、天然アミノ酸の集積が単に増殖開始からの時間に依存したものでなく、増殖活性に依存した集積になっていることを改めて確認するために、大腸菌の増殖が停止した状態の16°Cで培養し、その後37°Cに温度変更して増殖を開始させ、増殖開始前後での集積比較を行った。

A) 実験方法

II.と同様に大腸菌を準備し、160 rpm, 16°Cの低温で振盪培養し、培養開始後2h, 6h, 12hにII.で高い集積を示した³H標識 tyrosine, histidine を37 kBq 投与し、II.と同様に放射能を測定した。さらに、培養開始12hで37°Cに温度を変更し細菌の増殖を開始させて、増殖開始後2h (培養開始後14h), 6h (培養開始後18h), 12h (培養開始後24h)で³H標識 tyrosine, histidine を37 kBq 投与し、II.と同様に放射能を測定した。

B) 結果と考察

Fig.5 に示すように各³H標識天然アミノ酸の大腸菌への集積は大腸菌の増殖が停止している16°Cではすべての時間で細菌の増殖において菌数の少ない誘導期と同程度の低い集積を示した。一方、培養温度を37°Cに変更して増殖を開始してからは細菌の増殖活性に合わせた集積が見られ、tyrosine の集積は対数増殖期を反映し、histidine の集積は定常期を反映しており、II.と同様に³H標識天然アミノ酸の集積が大腸菌の増殖に関連していることが確認できた。また、増殖開始後の³H標識天然アミノ酸の集積が最も高くなる際に蛋白組み込みも多くなり、代謝活性との相関性も確認できた。よって、大腸菌の増殖活性と³H標識天然アミノ酸の集積は関連性があり、増殖に伴う蛋白合成などの大腸菌の代謝活性が集積に関係していると考えられた。

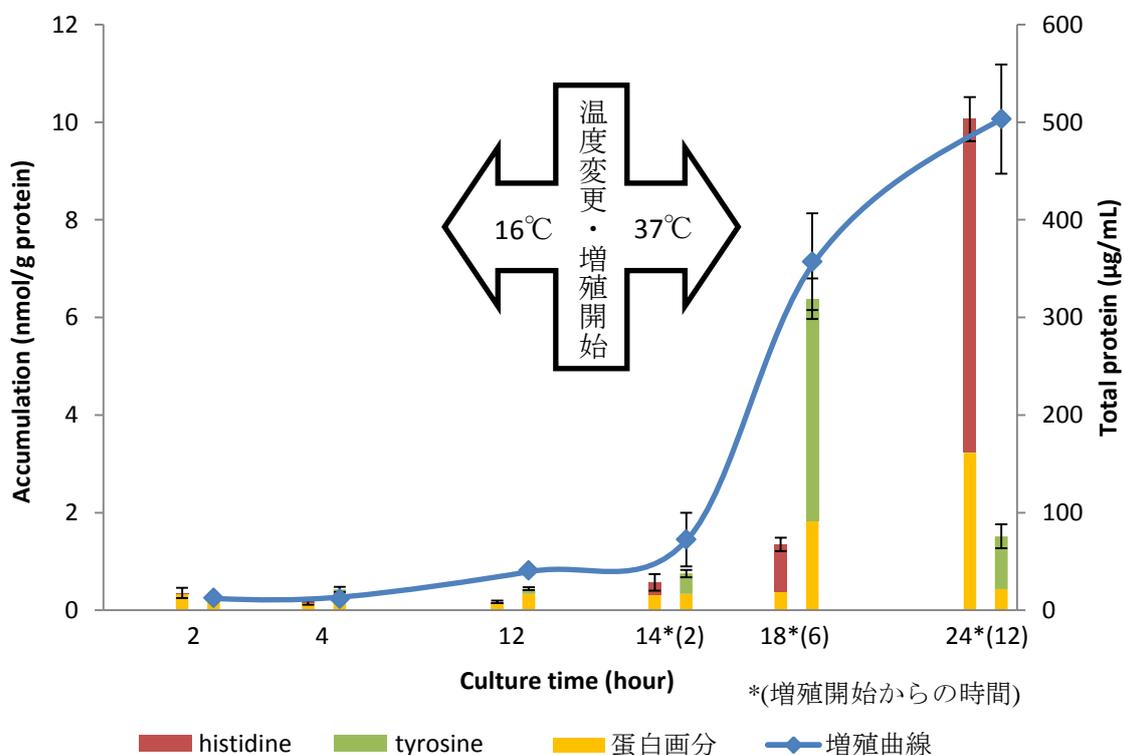


Fig.6 ³H 標識天然アミノ酸の集積と低温培養蛋白組み込み率

IV. 結語

³H 標識した天然アミノ酸及び 2DG の集積と細菌の増殖活性との関連性に加え、増殖活性に伴う蛋白合成などの代謝活性との相関性も明らかとなり、代謝活性が細菌への天然アミノ酸の集積に関係していると考えられた。中でも ³H 標識した天然アミノ酸の L-tyrosine, L-methionine は細菌の増殖活性が増強する段階での集積が高く、細菌感染症早期画像診断には有用であり、すでに臨床で利用されている標識天然アミノ酸[S-methyl-¹¹C]-L-methionine を用いた PET 検査による細菌感染症画像診断の可能性が示された。

V. 謝辞

本研究を終えるにあたりご指導くださいました川井 恵一 教授、金沢大学医薬保健研究域附属健康増進科学センターの小林 正和 助教、ご協力いただきました松榮 美希さん、井原 正明さんをはじめ検査技術科学 岡本研究室と本研究室の方々に心より御礼申し上げます。

VI. 参考文献

- 1) 泉山典子, 三木祐, 宍倉裕, 川口千晴, 斎藤若奈, 菊地正, 熊谷勝紀, 笹森寛, 菊池喜博: 急激な経過で死亡したA群β溶血性レンサ球菌による肺炎の1例. 日呼吸会誌, 46: 488-492 (2008).
- 2) 柳雅彦, 榎本克巳, 鈴木史孝, 川田一也, 三浦義昭: 早期診断・治療しえた劇症型溶連菌感染症の1例. 日本内科学会雑誌 創立100周年記念号, 91: 227-229 (2002).
- 3) van Oosten M, Hahn M, Crane LM: Targeted imaging of bacterial infections: advances, hurdles and hopes. *FEMS Microbiol Rev*, 39: 892-916 (2015).
- 4) Love C, Tomas MB, Tronco CG, Palestro CJ: FDG PET of infection and inflammation. *RadioGraphics*, 25: 1375-1368 (2005).
- 5) Kiel DN, Javier E, Villanueva-Meyer, Christopher AM, Robert R. F, Joseph EB, Tiffany K, Renuka S, Henry FV, Oren SR, Michael AO, David M.W: Imaging active infection *in vivo* using D-amino acid derived PET radiotracers. *Scientific REPOrTS*, 7: 7903: 1-8 (2017).
- 6) Burkovski A, Krämer R: Bacterial amino acid transport proteins: Occurrence, functions, and significance for biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 58: 265-274 (2002)