

## 標識アミノ酸の光学異性体の特性を利用した 細菌感染症画像診断法の検討

村中 由佳

(指導教員：川井 恵一 教授、水谷 明日香 助教)

要旨：細菌感染症の診断法として現在用いられている細菌培養法は、侵襲的で長時間を要するため、症状の進行が急激である劇症型感染症等にはより迅速な診断法が望まれる。本研究では、現在の感染症の診断法に代わる手法として感染早期での画像診断法の可能性を検討した。感染症の原因細菌の増殖活動が盛んな対数増殖期におけるアミノ酸の細菌とヒト細胞への集積を比較するために、安全性の高い大腸菌 K-12 株、ヒト表皮角化細胞である HaCaT 細胞を用いた。標識体には、対数増殖期で高集積を示し、かつ臨床で  $^{11}\text{C}$  標識体が PET 診断に用いられている [S-methyl- $^3\text{H}$ ]-L-methionine ( $^3\text{H}$ -L-Met)、及びその光学異性体である [S-methyl- $^3\text{H}$ ]-D-methionine ( $^3\text{H}$ -D-Met) を選択した。集積実験の結果、 $^3\text{H}$ -L-Met は投与後早期から大腸菌への高集積を示したものの、HaCaT 細胞への集積も経時的に増加したため、投与後 60 分において大腸菌と細胞間で集積差が僅かとなった。一方、 $^3\text{H}$ -D-Met は大腸菌への集積が経時的に増加したのに対し、HaCaT 細胞への集積は低かったため、投与後 60 分において HaCaT 細胞への集積量の 10 倍以上の集積を示した。また、蛋白組込み率と集積量に関連が見られ、蛋白組込み率が多いと集積も高い傾向があった。 $^3\text{H}$ -D-Met において、大腸菌と HaCaT 細胞間で集積量と蛋白組込み率に大きな差が見られたことより、大腸菌と HaCaT 細胞間の高いコントラストを期待できるため、これを利用した細菌感染症の感染早期での画像診断が有用である可能性が示された。

### 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を要するため、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<sup>1,2)</sup>などの診断には適さない。当研究室の先行研究において、Fig. 1 に示す細菌の増殖曲線を増殖活性の確認指標として用いた細菌感染症早期画像診断の検討を行ってきた。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評価の結果、L-tyrosine や L-methionine などの  $^3\text{H}$  標識天然アミノ酸は、大腸菌の増殖活性が極めて急速に増強する対数増殖期において高い集積を示すことが確認され、細菌感染症早期画像診断に有用であることを提唱してきた<sup>3)</sup>。一方、本研究室では、ヒトの腫瘍細胞（膠芽腫）において L-Met, D-Met の集積の違いについての研究<sup>4,5)</sup>などを行った経験から、L-Met の光学異性体で、一般に代謝安定性を有するとされる D 体アミノ酸であり、 $^{11}\text{C}$ -L-Met と同様に、ヨウ化メチルから光学活性を保持したまま短時間合成が可能という利点を持つ D-Met に着目してきた。これらの背景から本研究では、標識アミノ酸の対数増殖期における細菌への集積と細胞への集積の違いを調べるために比較検討を行った。標識体には、臨床で  $^{11}\text{C}$  標識体が PET 診断に用いられており、細菌の増殖活性が増強する対数増殖期で高集積を示す (Fig. 1) ことを確認している [S-methyl- $^3\text{H}$ ]-L-methionine ( $^3\text{H}$ -L-Met)、及び構成原料に D 体を用いて同じ標識反応で合成することができる [S-methyl- $^3\text{H}$ ]-D-methionine ( $^3\text{H}$ -D-Met) を使用した。

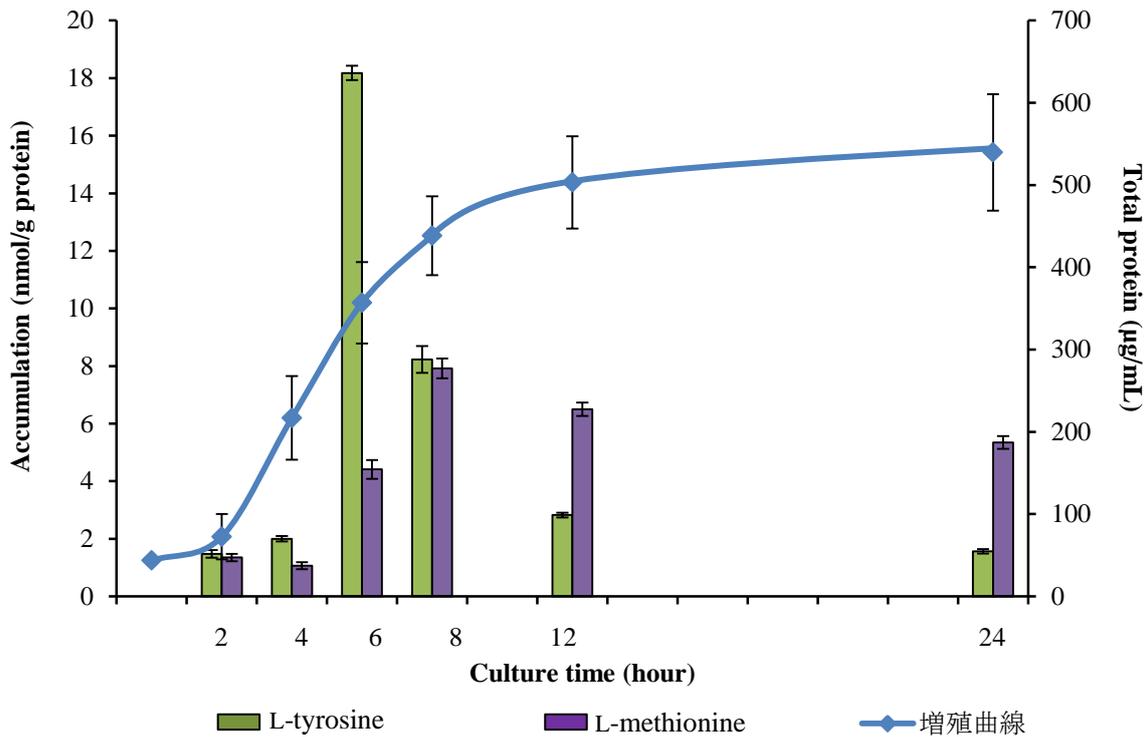


Fig. 1 大腸菌の増殖曲線と[S-methyl-<sup>3</sup>H]-L-tyrosine, [S-methyl-<sup>3</sup>H]-L-methionine の集積<sup>3)</sup>

## II. 対数増殖期でのアミノ酸の細菌と細胞への集積実験

### (A) 実験方法

放射性トレーサーには PET 薬剤と同様に L-methionine の S-methyl 基を <sup>3</sup>H で標識した <sup>3</sup>H-L-Met とその光学異性体である <sup>3</sup>H-D-Met を用い、細菌と細胞への集積を確認した。実験で用いる細菌には安全性の高い大腸菌 K-12 株、細胞にはヒト表皮角化細胞株である HaCaT 細胞を選択した。

細菌集積実験は、上記の大腸菌を事前に 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> で 12 時間以上培養して行った。測定用培地としてアミノ酸不含有の D-MEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, 富士フィルム和光純薬) 5 mL に菌液を 200 µL 加え、160 rpm, 37 °C で振盪培養し、対数増殖期 (培養開始後 8 時間) に標識アミノ酸を 37 kBq 投与し、37 °C の温浴中で穏やかに振盪しながら、5 分、30 分、60 分間取込ませた。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 phosphate buffered saline (pH 7.0) (PBS, タカラ) を 5 mL 加えて、遠心分離を 3 回行い、洗浄した。洗浄終了後、上清を除去して、ペレットをほぐし 0.1 M NaOH (Nacalai tesque) 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液体シンチレーションカウンタで測定した。蛋白組込み率の測定は、0.1 M NaOH を 1 mL 加えた後、500 µL 分取し大腸菌に集積した放射能を測定するとともに、残った菌液から 190 µL を分取し、最終濃度 5% となるように氷冷 100 % トリクロロ酢酸 (Nacalai tesque) を 10 µL 加え全量ガラスフィルター (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 加えた後、その溶液も全量フィルターに加え 3 回洗浄をした。フィルターを乾燥させ蛋白を固定し、蛋白に組込まれた放射能を測定した。

細胞集積実験は、HaCaT 細胞を前日に well へ  $2 \times 10^5$  個播いたものを用いた。これを  $37^\circ\text{C}$  で穏やかに振盪しながら well 内培地を吸引し、D-MEM を incubation buffer として 10 分間コンディショニングし  $^3\text{H-L-Met}$  と  $^3\text{H-D-Met}$  を  $37\text{ kBq/sample}$  加え、穏やかに振盪しながら  $37^\circ\text{C}$  で 5 分、30 分、60 分間取込ませた。well 内の培地を吸引後、氷冷した D-MEM を  $500\ \mu\text{L}$  加え、再び吸引し洗浄した。洗浄終了後、 $0.1\ \text{M NaOH}$  を  $1\ \text{mL}$  加えて、HaCaT 細胞を溶解し、集積した放射能を測定した。蛋白組み込み率の測定は、 $0.1\ \text{M NaOH}$  を  $1\ \text{mL}$  加えた後、 $500\ \mu\text{L}$  分取して HaCaT 細胞に集積した放射能を測定するとともに、残った液から  $190\ \mu\text{L}$  を分取して、最終濃度  $5\%$  となるように氷冷  $100\%$  トリクロロ酢酸を  $10\ \mu\text{L}$  加え全量グラスフィルターに捕集し、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  $1\ \text{mL}$  加え、その溶液も全量フィルターに加えて 3 回洗浄した。フィルターを乾燥させ蛋白を固定し、蛋白に組込まれた放射能を測定した。

## (B) 結果と考察

$^3\text{H-L-Met}$  を用いて集積実験を行った結果、Fig. 2 に示すように、大腸菌へは投与後早期から高集積を示したものの、HaCaT 細胞への集積も経時的に増加したため、投与後 60 分においては大腸菌と HaCaT 細胞間で集積差は見られなかった。一方、 $^3\text{H-D-Met}$  では Fig. 3 に示すように大腸菌への集積が経時的に増加したが、HaCaT 細胞への集積は低かったため、投与後 60 分において大腸菌への集積は HaCaT 細胞への集積量の 10 倍以上の集積を示した。また、table 1 に示すように  $^3\text{H-L-Met}$  は大腸菌では投与後早期から蛋白組み込み率が高く、取込み時間が経過しても蛋白組み込み率が高い割合で一定であったが、HaCaT 細胞では取込み時間経過に伴って蛋白組み込み率が増加した。それに対し、一般に D 体のアミノ酸はヒトの細胞では蛋白合成に使用されないことが知られており、今回の実験でも table 2 に示したように  $^3\text{H-D-Met}$  の HaCaT 細胞への集積において蛋白組み込み率が非常に少ないものの、 $^3\text{H-D-Met}$  の大腸菌への集積においては、投与後早期から高い蛋白組み込み率を示し、 $^3\text{H-L-Met}$  の HaCaT 細胞と同程度の高い割合で蛋白に取込まれた。以上の結果から、蛋白組み込み率と集積量には関連があり、蛋白合成に組込まれる割合が多いと集積も高い傾向があると考えられた。 $^3\text{H-D-Met}$  において、大腸菌と HaCaT 細胞間で集積量のみならず蛋白に組込まれている割合にも大きな差が見られたことから、このコントラストを利用した細菌感染症の感染早期での画像診断の可能性が示された。

Table 1  $^3\text{H-L-Met}$  の蛋白組み込み率

	蛋白組み込み率(%)	
	大腸菌	HaCaT 細胞
5 min	28.6	11.3
30 min	31.9	22.6
60 min	32.0	31.5

Table 2  $^3\text{H-D-Met}$  の蛋白組み込み率

	蛋白組み込み率(%)	
	大腸菌	HaCaT 細胞
5 min	24.3	5.37
30 min	26.7	1.95
60 min	27.6	3.09

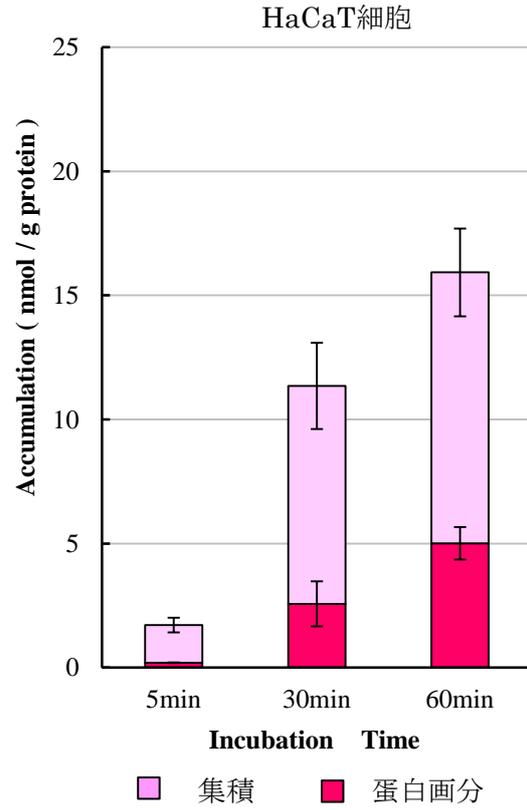
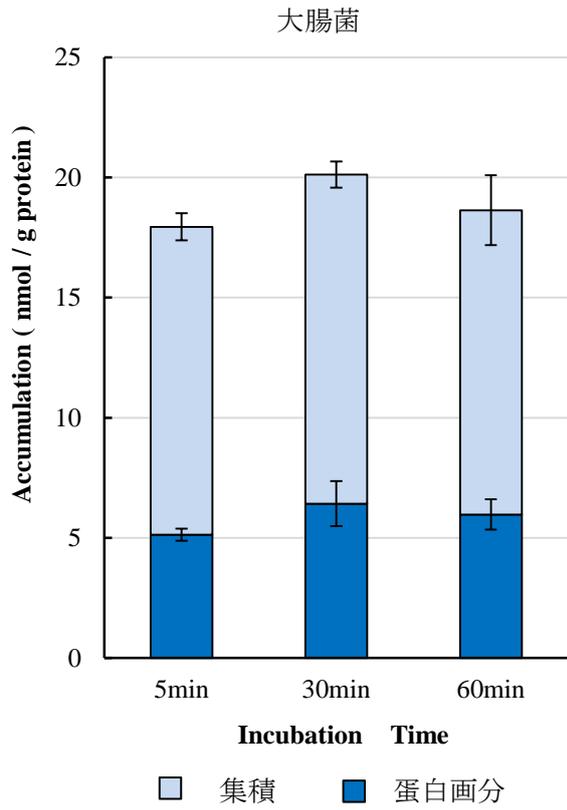


Fig. 2  $^3\text{H-L-Met}$  の大腸菌と HaCaT 細胞への集積と蛋白への組み込み

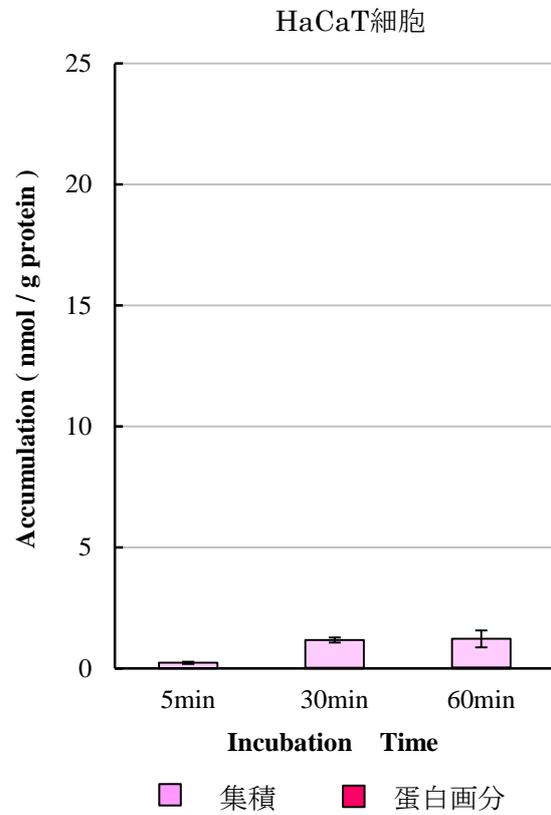
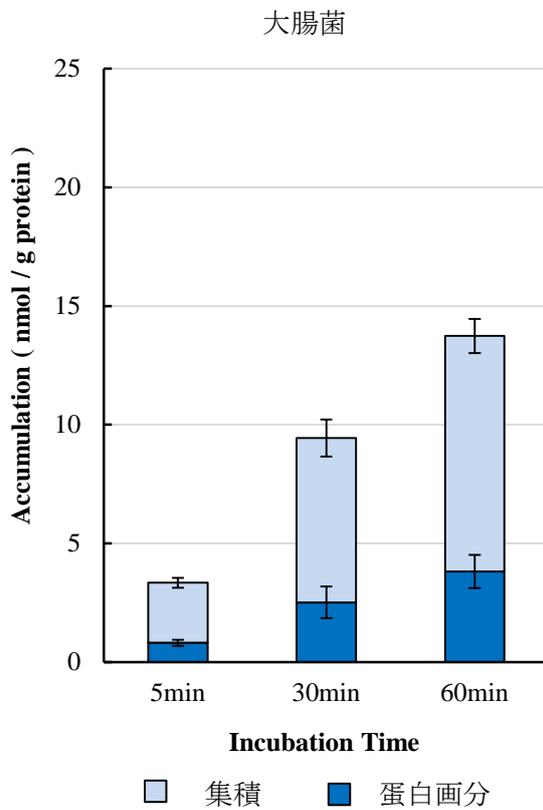


Fig. 3  $^3\text{H-D-Met}$  の大腸菌と HaCaT 細胞への集積と蛋白への組み込み

### III. 結語

一般にヒトの細胞では蛋白合成に使用されないD体のアミノ酸は、大腸菌では投与後早期から高い蛋白組込み率を示した。蛋白合成に組込まれる割合が多いと集積も高い傾向が認められ、D体のアミノ酸において細菌と細胞間での集積量及び蛋白組込み量の差が大きいことから、これを利用した細菌の増殖活性を反映した細菌感染症の感染早期での画像診断が有用である可能性が示された。

### IV. 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、小林正和助教、水谷明日香助教、ご協力いただきました病態検査学講座 松榮美希さん、湯浅善恵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。

### V. 参考文献

- 1) 泉山典子, 三木祐, 宍倉裕, 他: 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, 他: 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) 藤居紗暉子: 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. 金沢大学医薬保健学域保健学類学士課程論文, 2018.
- 4) Kobayashi M, Hashimoto F, Ohe K, et al: Transport mechanism of <sup>11</sup>C-labeled L- and D-methionine in human-derived tumor cells. Nucl Med Biol 39: 1213-1218, 2012.
- 5) Kobayashi M, Mizutani A, Nishii K, et al: Differences in accumulation and the transport mechanism of L- and D-methionine in high- and low-grade human glioma cells. Nucl Med Biol 44: 78-82, 2017.