

1904 SPECT 用放射性医薬品を用いた細菌感染症早期画像診断の可能性

仲本 恒弥

(指導教員：川井 恵一 教授，水谷 明日香 助教)

要旨：現在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，結果の判定までに時間を要するため，症状の進行が急激な劇症型感染症等の診断法としては不十分であり，細菌培養法に代わる迅速な診断法として PET 用放射性医薬品である ^{18}F -FDG を用いた画像診断法の研究が進んでいる．しかし， ^{18}F -FDG による感染症診断は前処置や生理的集積等の問題点が多く，特に細菌感染部位だけでなく炎症部位にも集積するため，細菌感染症による集積かどうかを判別するのが難しいとされている．そこで本研究では，現在臨床利用されており，汎用性が高く生理的集積部位が限局される SPECT 用放射性医薬品が，細菌感染症早期画像診断に応用できないか検討した．感染細菌モデルとした大腸菌 K-12 株の増殖活性と集積量の関連性を調べるため，細菌の培養時間を誘導期の 2 時間，対数増殖期の 6 時間，定常期の 12 時間と 3 つのタイムポイントに設定し，各 SPECT 用放射性医薬品の集積実験を行った．その結果， $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -GSA， $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -PMT， $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -フチン酸， ^{123}I -BMIPP で ^{18}F -FDG と同程度の高集積が得られたが，大腸菌 K-12 株の増殖活性と集積量の相関はそれぞれ異なった．以上より，細菌感染症の早期画像診断において集積機序が異なるこれらの SPECT 用放射性医薬品を応用できる可能性が示された．

I. はじめに

現在，細菌感染症の検査方法には細菌培養法が用いられている．しかし，この方法は診断が確定されるまでに時間を要するという問題点があり，症状の進行が急激で死亡率が高い劇症型感染症^{1,2)}等の診断には適さない．そこで，体内で細菌が増殖している段階で早期画像診断を行い細菌感染の有無を特定することで，短時間かつ感染後の早い段階での診断が可能になると考えた．当研究室の先行研究では，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おり，L-tyrosine 等の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³⁾．しかし，これらの天然アミノ酸を放射性医薬品として画像診断に利用するには， ^{11}C ， ^{13}N ， ^{15}O 等のアミノ酸構成元素である短半減期ポジトロン放出核種で標識する必要がある等，加速器による核種の製造や有機標識合成を迅速に行う必要がある等，臨床応用の観点から汎用性の低さが問題となる．そこで，現在臨床利用されている放射性医薬品を細菌感染症早期画像診断薬として応用することが有効であると考えた．一方，2-Deoxy-2- ^{18}F fluoro-D-glucose (^{18}F -FDG) は既に細菌感染症早期画像診断への応用研究が行われているものの，安静維持等の前処置が必要である上に生理的集積部位が多く，炎症にも集積する⁴⁾ ために，細菌感染症による集積かどうかを判別することが難しいと考えられる．そこで本研究では， ^{18}F -FDG と比較して集積部位が限局され，半減期の長さや前処置の容易さから汎用性の高い SPECT 用放射性医薬品を細菌感染症早期画像診断薬へと応用できないか検討した．

II. 各培養時間での ^{18}F -FDG の大腸菌への経時的集積実験

(A) 検討方法

細菌感染症早期画像診断を目的とした研究が既に報告されている ^{18}F -FDG を基準とするため、まずは本研究の検討条件における ^{18}F -FDG の細菌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 株を選択し、経時的集積実験には、上記の大腸菌を事前に 37°C , $5\% \text{CO}_2$ で 14 時間以上培養したものを使用した。培養培地として D-glucose 含有の Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM, 富士フィルム和光純薬) を用い、培地を希釈することで D-glucose 濃度を 4.5 mg/mL , 1.0 mg/mL , 0.1 mg/mL と 3 段階に変化させて実験を行った。3 つの濃度の培地それぞれ 20 mL に菌液を $800 \mu\text{L}$ 加え、 160 rpm , 37°C で振盪培養した。培養時間は増殖開始早期となる誘導期の 2 時間、菌体内の酵素活性が活発となり細菌が盛んに増殖する対数増殖期の 4, 6, 8 時間、栄養分の欠乏や有害代謝産物の蓄積により細菌の増殖速度が低下し死滅と増殖の割合が同程度となる定常期の 12 時間とした (Fig. 1)。各培養時間経過後に ^{18}F -FDG を 37 kBq 投与し、 37°C の温浴中で穏やかに振盪しながら、5 分間取り込ませた。その後、 4°C 冷却下 7000 G 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 1 mL 加えて、遠心分離を 2 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サンプルとした。サンプル内の大腸菌に集積した放射能をオートウェルγカウンタ (AccuFLEX ARC-8001, Aloka medical) で測定し、得られた cpm から式 (A) を用いて集積率 [%ID] を算出した。

$$\text{集積率 [\%ID]} = \frac{\text{サンプルから得られた counts [cpm]}}{\text{投与した放射能の counts [cpm]}} \times 100 \dots (A)$$

また、残ったサンプルから $20 \mu\text{L}$ 分取し BCA protein assay kit (Thermo fisher scientific) を用いて蛋白定量を行い、得られた蛋白量から細菌の増殖曲線を描いた。

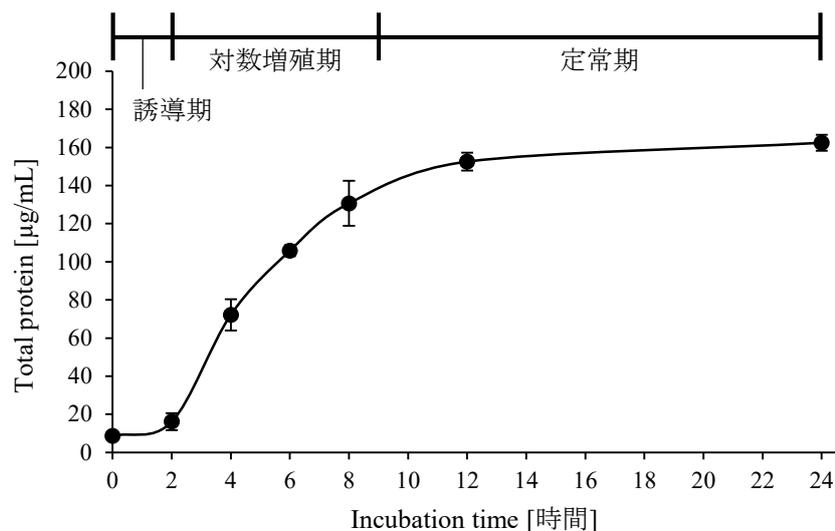


Fig. 1 大腸菌の増殖曲線

(B) 結果と考察

D-Glucose 濃度を変化させたときの増殖曲線の変化を Fig. 2 に示す。培地中の D-glucose 濃度を変化させても対数増殖期までの大腸菌 K-12 株の増殖活性に差は見られず、定常期のみ増殖傾向に差が確認された。また、それぞれの D-glucose 濃度に調整した培地中における、各増殖期を代表した誘導期の 2 時間、対数増殖期の 6 時間、定常期の 12 時間培養時の ^{18}F -FDG の結果を table 1 に示す。大腸菌 K-12 株の培養時間が長くなり、菌数が増加するほど ^{18}F -FDG の集積率は高くなった。また、培地中の D-glucose 濃度を低くすることで、より集積率が高くなったことから、 ^{18}F -FDG の細菌への集積は血糖値によって増減するヒトへの集積と同様に、周囲の糖濃度に影響されると考えられた。

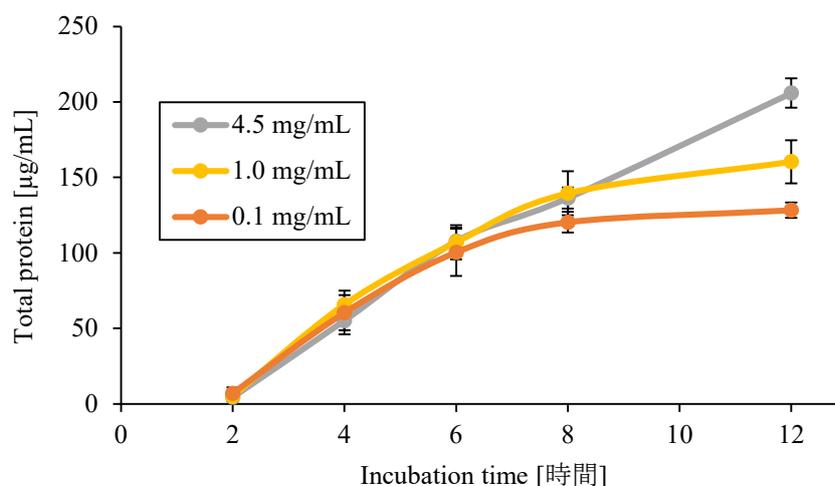


Fig. 2 D-Glucose 濃度を変化させたときの増殖曲線比較

Table 1 大腸菌 K-12 株への ^{18}F -FDG の集積

培地中 D-glucose 濃度	集積率 [%ID]		
	2 時間	6 時間	12 時間
4.5 mg/mL	0.02	0.02	0.05
1.0 mg/mL	0.02	0.04	4.70
0.1 mg/mL	0.04	4.56	12.8

III. 各培養時間での SPECT 用放射性医薬品の細菌への経時的集積実験

(A) 検討方法

II-A の検討と同様の条件で培養した大腸菌 K-12 株を使用した。培養培地としてアミノ酸不含有の D-MEM 10 mL に菌液を 400 μL 加え、160 rpm, 37 $^{\circ}\text{C}$ で各増殖期を代表した 2 時間、6 時間、12 時間振盪培養した。各培養時間経過後に臨床で使用されている SPECT 用放射性医薬品 ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ 製剤 13 種類, ^{123}I 製剤 3 種類, ^{125}I 製剤 2 種類, ^{67}Ga 製剤, ^{111}In 製剤, ^{201}Tl 製剤各 1 種類の計 21 種類) を 37 kBq 投与し、37 $^{\circ}\text{C}$ の温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、4 $^{\circ}\text{C}$ 冷却下 7000 G 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 を 1 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 を 1 mL 加えて大腸菌を溶解しサンプルとした。サンプル内の大腸菌に集積した放射能をオートウェルγカウンタ (AccuFLEXγ7000, Aloka medical) で測定し、IIと同様に得られたcpmから式 (A) を用いて集積率 [%ID] を算出した。また、残ったサンプルから 20 μL 分取し BCA protein assay kit を用いて蛋白定量を行い、得られた蛋白量から細菌の増殖曲線を描いた。

(B) 結果と考察

SPECT 用放射性医薬品を用いて経時的集積実験を行った結果を table 2 に示す。心筋脂肪酸代謝シンチグラフィに用いられている 15-(4-[¹²³I]iodophenyl)-3-(R,S)-methylpentadecanoic acid (¹²³I-BMIPP)、肝受容体シンチグラフィに用いられている ^{99m}Tc-diethylenetriaminepentaacetic acid-galactosyl human serum albumin (^{99m}Tc-GSA)、肝脾シンチグラフィやセンチネルリンパ節シンチグラフィに用いられている ^{99m}Tc-phytate (^{99m}Tc-フチン酸)、肝胆道シンチグラフィに用いられている ^{99m}Tc-N-pyridoxyl-5-methyltryptophan (^{99m}Tc-PMT) では、培地中の D-glucose 濃度を低下させたときの ¹⁸F-FDG と同程度の高集積 (table 1) が得られたものの、他の製剤では上記 4 製剤の次に高集積であった ^{99m}Tc-2,3-dimercaptosuccinic acid (^{99m}Tc-DMSA) 以下の集積しか得られなかった。Fig. 3 に高集積が得られた 4 製剤と大腸菌 K-12 株の各増殖期との関連性を示す。¹²³I-BMIPP では大腸菌 K-12 株の培養時間が長くなるにつれて集積の増加が見られた。ヒトにおける ¹²³I-BMIPP の集積機序より、大腸菌 K-12 株の菌体内においてエネルギー代謝として脂肪酸代謝が亢進していると考えられた。また、^{99m}Tc-GSA では増殖期との相関がなく、常に一定の集積が見られた。ヒトにおいては、血清アルブミンに galactose を導入した ^{99m}Tc-GSA を肝受容体に取り込むことから、大腸菌 K-12 株にも同様に galactose を認識する受容体に類似した機構が発現しているように見える。しかし、^{99m}Tc-GSA の大腸菌 K-12 株への集積が菌の増殖に依存していないことから、菌数に影響されない他の要因によるものではないかと考えられた。^{99m}Tc-フチン酸と ^{99m}Tc-PMT では増殖が進行するにつれて集積の減少が見られた。これらの SPECT 用放射性医薬品は誘導期に多く取り込まれていることから、増殖環境に適応し、増殖を開始していく段階に多く利用されると考えられた。

Table 2 大腸菌 K-12 株への SPECT 用放射性医薬品の集積

SPECT 用 放射性医薬品	集積率 [%ID]		
	2 時間	6 時間	12 時間
¹²³ I-BMIPP	7.11	10.7	12.5
^{99m} Tc-GSA	4.82	5.48	5.10
^{99m} Tc-フチン酸	17.0	14.2	9.00
^{99m} Tc-PMT	4.09	2.53	—※
^{99m} Tc-DMSA	0.34	0.35	0.49

※ ^{99m}Tc-PMT のみ放射能不足により、12 時間未検討

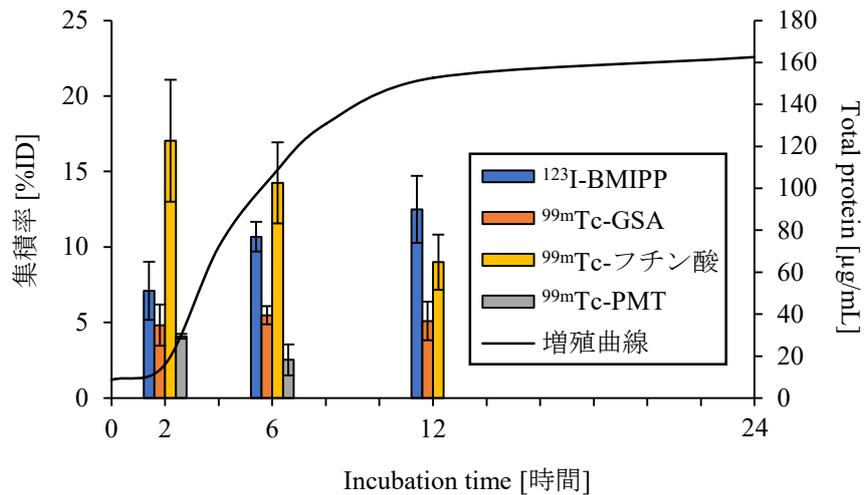


Fig. 3 大腸菌 K-12 株の各増殖期と各 SPECT 用放射性医薬品の集積の関連性

IV. 結語

大腸菌 K-12 株が特定の SPECT 用放射性医薬品を取り込むことが明らかとなった。また、大腸菌 K-12 株への SPECT 用放射性医薬品の異なる集積傾向が確認できたことから、細菌感染症早期画像診断において SPECT 用放射性医薬品を応用できる可能性が示された。

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，小林正和准教授，水谷明日香助教，検査技術科学専攻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，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．2008; 46: 488-492.
- 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．2002; 91: 227-229.
- 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) Signore A, Glaudemans AW. The molecular imaging approach to image infections and inflammation by nuclear medicine techniques. *Ann Nucl Med.* 2011; 25: 683-700.