

2104 大腸菌 EC-14 株感染マウスを用いた ¹²³I-BMIPP の細菌感染症画像診断薬としての可能性

大岩 裕弥

(指導教員：川井 恵一 教授、水谷 明日香 助教)

要旨：一般に細菌感染症の診断方法に用いられている細菌培養法は侵襲的かつ診断の確定までに長時間を要するため、それに代わる迅速な診断法が望まれている。現在、体内の糖代謝を可視化することでがんの診断などに使用されている ¹⁸F-FDG を用いた細菌感染症画像診断法の研究が進んでいるが、細菌感染部位だけでなく炎症にも集積するために細菌感染症による集積が判断が難しいことや絶食などの前処置が多いという問題点がある。そこで本研究では、大腸菌 EC-14 株への細菌集積実験で高い集積を示した心筋脂肪酸代謝シンチグラフィ製剤である ¹²³I-BMIPP と細菌感染症画像診断への応用が期待されている ¹⁸F-FDG を用いて、細菌感染症画像診断の可能性を検討した。モデル細菌には病原性を有する大腸菌 EC-14 株を使用した。予め免疫抑制処理を施したマウスの片側の腓腹筋に EC-14 株を播種して感染 2 時間後と 8 時間後の感染モデルマウスを作製し、それぞれに放射性医薬品を投与した後一定時間経過後に組織を採取して重量集積率の評価を行った。その結果、2 製剤とも感染部位への集積が非感染部位の集積と比べて高くなる傾向が認められた。特に、¹²³I-BMIPP では感染 8 時間後に ¹⁸F-FDG と比べて感染部位と非感染部位との高いコントラストが得られ、翌日まで維持したマウスの static 画像においては感染腓腹筋への集積が可視化された。以上より、¹²³I-BMIPP を利用した細菌感染症画像診断法の可能性が示された。

I. はじめに

現在、細菌感染症の診断は主に細菌培養法によって行われている。しかし、患者から検体を採取するため侵襲的であることや最短でも 1 日以上時間を要してしまうことから、症状の進行が急激で重篤率が高い劇症型感染症^{1,2)}などではより迅速な診断が望まれている。そこで本研究グループは、非侵襲的で比較的時間がかからず、生体感染部における細菌の増殖活性を検出でき、感染部位の特定や治療効果のフォローアップも期待できる新たな診断法として、核医学領域における画像診断法の確立を目指してきた。細菌感染症画像診断法の開発においては、体内の糖代謝を可視化することでがんの診断などに使用されている 2-deoxy-2-[¹⁸F]fluoro-D-glucose (¹⁸F-FDG) を応用する研究³⁾が進められているが、¹⁸F-FDG は細菌感染部位だけでなく炎症にも集積してしまうため、細菌感染と炎症で鑑別が困難である⁴⁾ことや、投与前の絶食や投与後安静など前処置が多いといった問題点がある。そこで本研究では、現在臨床利用されている SPECT 用放射性医薬品の中で数種の細菌へ特に高い集積を示すことを確認した心筋脂肪酸代謝シンチグラフィ製剤である 15-(4-[¹²³I]iodophenyl)-3-(R,S)-methylpentadecanoic acid (¹²³I-BMIPP) の細菌感染症画像診断法への応用性を確認するために、細菌感染モデルマウスを用いた感染部位への集積評価を行った。

II. 腓腹筋感染モデルマウスの作製

本研究では、塩野義製薬株式会社から譲渡された臨床分離株であり、病原性を有する大腸菌 *Escherichia coli* (*E.coli*) EC-14 株を選択した。前々培養、前培養の培地として Todd's hewitt broth (Becton, Dickinson and company) に、0.2 % yeast extract (Becton, Dickinson and company) を添加した THY 培地を用いた。37 °C、5 %CO₂ 条件下で、前々培養は 9 時間、前培養は 14 時間振盪培養した。この前培養液を新しい THY 培地に播種し (前培養液 : THY 培地 = 1 : 100)、37 °C、160 rpm 条件下で 12-14 時間培養した。培養後、培養菌液を 4 °C、8000 G の条件下で 5 分間遠心分離し、菌体を回収後、Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM, 富士フイルム和光純薬) で懸濁した。懸濁液をさらに D-MEM で 10 倍希釈し、約 5.0×10^7 CFU/0.1 mL の菌液を作製した。実験動物には ICR マウス (5 週齢、雄、日本クレア) を使用した。免疫抑制剤であるシクロフォスファミド (富士フイルム和光純薬) を感染 4 日前に 150 mg/kg、感染 1 日前に 100 mg/kg 腹腔内投与して免疫抑制処置を行った後、3 種混合麻酔 (酒石酸ブトルファノール、ミタゾラム、塩酸メドトミジン) 下で大腸菌 EC-14 株 (約 5.0×10^7 CFU/0.1 mL/mouse) を右側の腓腹筋に播種して腓腹筋感染モデルマウスを作製した。なお、播種後の感染時間は本研究グループの先行研究⁵⁾をもとに、感染早期の 2 時間後と細菌が十分に増殖した 8 時間後を選択し、以降の検討を行った。

III. 腓腹筋感染モデルマウスを用いた集積検討

(A) 検討方法

II に示した方法で作製した感染 2 時間後と感染 8 時間後の腓腹筋感染モデルマウス (各 n = 4) を用いて、放射性医薬品の体内分布の評価を行った。放射性医薬品は ¹²³I-BMIPP と ¹⁸F-FDG を使用した。感染 2 時間後と感染 8 時間後に放射性医薬品 (¹²³I-BMIPP : 約 370 kBq/匹、¹⁸F-FDG : 約 10 MBq/匹) を尾静脈から投与して 15 分後と 60 分後にマウスを屠殺し、感染腓腹筋、および対側の非感染腓腹筋を採取した。なお、放射性医薬品投与前に 4 時間の絶食処置を施した。採取した腓腹筋を約 100 mg 程度に分割し、1.0 mL の可溶化剤ソルバブル (PerkinElmer) を添加して溶解させたサンプルを作製し、各組織に集積した放射性医薬品の放射能を測定した。このとき、¹²³I-BMIPP の放射能はオートウェルγカウンタ (AccuFLEX ARC-7010, Aloka Medical) で、¹⁸F-FDG の放射能は高エネルギーγ線測定用であるオートウェルγカウンタ (AccuFLEX ARC-8001, Aloka Medical) で測定し、式 (A) を用いて重量集積率を、式 (B) を用いてコントラストを算出した。また、採取した感染腓腹筋の一部を生理食塩水により希釈後、寒天培地に塗抹して 37 °C、5 %CO₂ で 24 時間培養し、寒天培地上に生育したコロニー数を測定することでマウス腓腹筋における菌数を算出し、作製したモデルマウスの感染が成立していることを確認した。

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

$$\text{コントラスト} = \frac{\text{感染腓腹筋の重量集積率 [\%ID/g]}}{\text{非感染腓腹筋の重量集積率 [\%ID/g]}} \dots (B)$$

(B) 結果と考察

感染腓腹筋と非感染腓腹筋の重量集積率とコントラストを table1 に示す。2 製剤とも感染部位への集積が非感染部位への集積に比べて高くなる傾向が見られた。特に、感染 8 時間後において $^{123}\text{I-BMIPP}$ では $^{18}\text{F-FDG}$ と比較して感染部位と非感染部位との高いコントラストが得られ、感染部位への有意な重量集積率の向上が見られた。 $^{123}\text{I-BMIPP}$ は心筋炎に対して集積低下を示す⁶⁾との報告があり今回の研究においても炎症への集積ではなく感染 8 時間後の感染部位における細菌の増殖を反映したためだと考えられる。これに対して、 $^{18}\text{F-FDG}$ では感染 2 時間後、感染 8 時間後ともに感染部位と非感染部位の重量集積率に有意な差が見られなかった。また、感染 8 時間後で感染腓腹筋、非感染腓腹筋ともに高い重量集積率を示した。これは、腓腹筋感染モデルマウスを作製後に腹腔麻酔で安静を維持しているが、麻酔の効果が 2-3 時間程度で切れるためマウスが覚醒して活発に運動したことによる生理的集積の増加が影響したと考えられる。

Table1 感染モデルマウスにおける感染腓腹筋と非感染腓腹筋の重量集積率

| 体内分布 | | $^{123}\text{I-BMIPP}$ | | $^{18}\text{F-FDG}$ | | |
|---------|--------|------------------------|-------------------------------|---------------------|------------------|------|
| | | %ID/g | contrast | %ID/g | contrast | |
| 感染 2 時間 | RI 投与後 | 感染腓腹筋 | 6.09 ± 3.72 | 1.15 | 1.69 ± 0.50 | 1.05 |
| | 15 分 | 非感染腓腹筋 | 5.30 ± 0.72 | | 1.61 ± 0.53 | |
| | RI 投与後 | 感染腓腹筋 | 6.13 ± 1.14 | 1.00 | 2.47 ± 0.69 | 0.97 |
| | 60 分 | 非感染腓腹筋 | 6.10 ± 1.03 | | 2.54 ± 0.81 | |
| 感染 8 時間 | RI 投与後 | 感染腓腹筋 | 6.82 ± 2.02 ^{**} | 1.29 | 11.54 ± 3.91 | 1.09 |
| | 15 分 | 非感染腓腹筋 | 5.29 ± 0.63 | | 10.63 ± 4.46 | |
| | RI 投与後 | 感染腓腹筋 | 8.64 ± 1.80 ^{**} | 1.31 | 11.38 ± 3.96 | 1.15 |
| | 60 分 | 非感染腓腹筋 | 6.59 ± 0.80 | | 9.90 ± 4.72 | |

^{**} $p < 0.01$ vs. 非感染腓腹筋

IV. $^{123}\text{I-BMIPP}$ を用いた腓腹筋感染モデルマウスのイメージング

(A) 検討方法

II の検討と同様の条件で腓腹筋感染モデルマウスを作製し、 $^{123}\text{I-BMIPP}$ を投与してイメージングを行った。III の検討において感染腓腹筋への有意な重量集積率の向上が見られた感染 8 時間後のモデルマウス ($n = 2$) を選択して、 $^{123}\text{I-BMIPP}$ ($18.5 \text{ MBq}/300 \mu\text{L}/匹$) を尾静脈から投与した。撮像条件は matrix : 512×512 、拡大率 : 100%とし、3 種混合麻酔下でガンマカメラ (MiniCam C, Inter Medical) を用いて $^{123}\text{I-BMIPP}$ 投与後 15 分から 5 min/frame で 2 時間 dynamic 撮像した。また、その後適宜 5 min の static 撮像を追加した。

(B) 結果と考察

Fig. 1 に $^{123}\text{I-BMIPP}$ 投与後 1 時間と 13 時間における static 画像を示す。体内分布の結果において最もコントラストがついた $^{123}\text{I-BMIPP}$ 投与後 1 時間の条件でも画像上では腓腹筋への集積左右差は確認されなかった。これは体幹部への $^{123}\text{I-BMIPP}$ の集積が高く、バックグラウンドの影響に

よって感染部位が描出されなかったためだと考えられる。一方、 ^{123}I -BMIPP 投与後 13 時間の条件では、感染部位が可視化され非感染部位と比べて高いコントラストが得られた。 ^{123}I -BMIPP が体外へ排泄されたことによって体幹部の集積が低下し、バックグラウンドの影響が小さくなることで感染部位が可視化されたと考えられる。

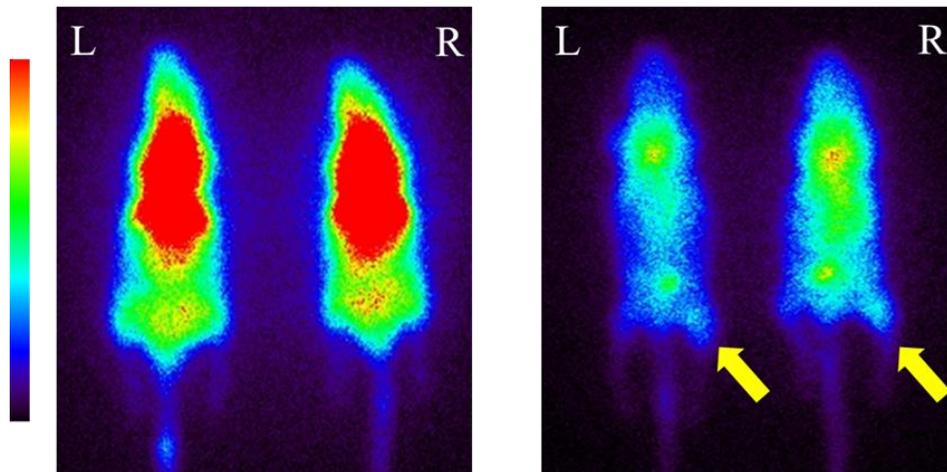


Fig. 1 感染 8 時間後のモデルマウスにおける
 ^{123}I -BMIPP 投与後 1 時間 (左)、13 時間 (右) の static 画像

V. 結語

体内分布において ^{123}I -BMIPP は ^{18}F -FDG と比較して感染部位への高いコントラストが得られ、感染 8 時間後では感染部位への有意な重量集積率の向上が見られた。また、感染 8 時間後のモデルマウスに ^{123}I -BMIPP を投与した 13 時間後の static 画像では感染部位への集積が可視化された。以上より、 ^{123}I -BMIPP を利用した細菌感染症画像診断法の可能性が示された。

VI. 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へ心より御礼申し上げます。

VII. 参考文献

- 1) Stevens DL, Tanner MH, Winship J, et al. Severe group A streptococcal infections associated with a toxic shock-like syndrome and scarlet fever toxin A. *N Engl J Med.* 321(1): 1-7; 1989.
- 2) Stevens DL. Invasive group A streptococcus infections. *Clin Infect Dis.* 14(1): 2-11; 1992.
- 3) Love C, Tomas MB, Tronco CG, et al. FDG PET of infection and inflammation. *Radio graphics.* 25(5): 1375-1368; 2005.
- 4) Signore A, Glaudemans AW. The molecular imaging approach to image infections and inflammation by nuclear medicine techniques. *Ann Nucl Med.* 25(10): 683-700; 2011.
- 5) 米澤茜音. In vitro ならびに in vivo において *Escherichia coli* EC-14 株の増殖活性の指標となり得るアミノ酸の検索. 金沢大学大学院医薬保健学総合研究科保健学専攻博士前期課程論文. 2021.
- 6) Tsujimura E, Kusuoka H, Fukuchi K, et al. Changes in perfusion and fatty acid metabolism of rat heart with autoimmune myocarditis. *Ann of Nucl Med.* 14(5): 361-367; 2000.