

2105 大腸菌 EC-14 株への ^{123}I -BMIPP 集積機序の検討

長田 朋子

(指導教員：川井 恵一 教授、水谷 明日香 助教)

要旨：現在、感染早期に病原菌の増加を検出する診断法が望まれており、本研究室では、既存の放射性医薬品を用いた非侵襲的な細菌感染症画像診断法の開発を目指してきた。これまでに、心筋脂肪酸代謝シンチグラフィに用いられる ^{123}I -BMIPP が、*in vitro*, *in vivo* ともに大腸菌 EC-14 株に対して高集積を示すことを確認していることから、本研究では、その集積メカニズムの解明を目的とした。代謝活性低下条件およびヒト細胞における脂肪酸輸送系に関与する膜輸送タンパクの阻害剤である sulfosuccinimidyl oleate (SSO) と lipofermata の 2 種類の薬剤が ^{123}I -BMIPP の集積に及ぼす影響を検討した。低温培養により細菌の代謝活性を低下させた結果、集積率は顕著に減少した。また、SSO を負荷した場合は集積率が減少したことから、大腸菌 EC-14 株への ^{123}I -BMIPP の集積はヒト細胞への集積機序と同様、脂肪酸輸送系膜タンパクの 1 つである CD36 が関与していることが示された。さらに、*in vivo* 感染巣の環境を想定した弱酸性条件において集積変化を確認したところ、 ^{123}I -BMIPP の集積率が増加した。本研究により ^{123}I -BMIPP の集積は細菌の代謝活性を反映し、その集積機序は脂肪酸輸送系膜タンパクが関与していることを見出した。加えて、体内の感染巣に近い環境下の菌の検出に適していることが明らかになった。

I. はじめに

一般的に、細菌感染症の診断には細菌培養法が用いられているが、これは検体を採取するため侵襲的で、結果の判定までに時間を要する。そのため、本研究室では既存の放射性医薬品を応用した感染の有無や感染部位を短時間で確認できる新たな非侵襲的な細菌感染症早期画像診断法の開発を検討してきた^{1,2)}。その結果、心筋脂肪酸代謝シンチグラフィに用いられる ^{123}I -BMIPP が *in vitro*, *in vivo* ともに大腸菌 *Escherichia coli* (*E.coli*)

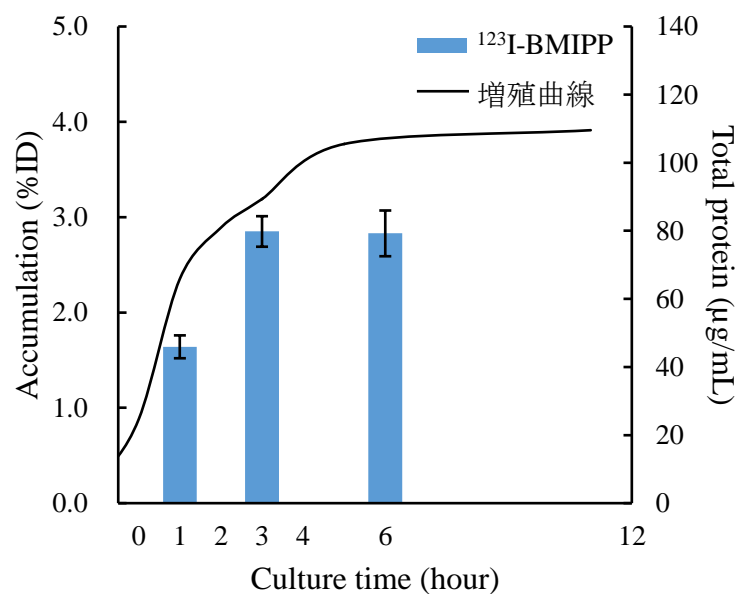


Fig. 1 大腸菌 EC-14 株における増殖曲線と ^{123}I -BMIPP の集積

EC-14 株に対して高集積を示し、

大腸菌 EC-14 株の増殖活性に伴って ^{123}I -BMIPP が取り込まれることを確認した (Fig. 1)²⁾。そこで本研究では、大腸菌 EC-14 株への ^{123}I -BMIPP 集積メカニズムの解明を目的とした。

II. 低温条件での ^{123}I -BMIPP 集積実験

A) 検討方法

大腸菌 EC-14 株への ^{123}I -BMIPP の取り込みが代謝依存的であることを確認するために、代謝活性が低下する低温条件下での集積検討を行った。実験で用いる細菌には病原性細菌として塩野義製薬株式会社から譲渡された臨床分離株である大腸菌 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、好気条件下で、前々培養は 9 時間、前培養は 14 時間振盪培養した。本培養にはアミノ酸不含 Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM, 富士フイルム和光純薬) 培地を用い、4 °C または 37 °C で ^{123}I -BMIPP の取り込みが多い対数増殖期の 3 時間まで培養した。 ^{123}I -BMIPP を 37 kBq/10 μL 投与し、それぞれ 4 °C の低温と 37 °C の温浴中で 5 分間取り込ませた後、7000 G, 4 °C で 10 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 7.4) (PBS, タカラ) を加えて、遠心分離し、洗浄した。2 回洗浄した後、上清を除去して、ペレットをほぐし、0.1 N NaOH 水溶液 (Nacalai tesque) を 1.0 mL 加えて菌体を溶解した。その後、大腸菌 EC-14 株に集積した放射能をオートウエル γ カウンタ (AccuFLEX ARC-7010, Aloka medical) で測定してその集積率を control と比較した。

B) 結果と考察

低温条件で ^{123}I -BMIPP の集積実験を行った結果を Fig. 2 に示す。37 °C で取り込ませた control と比べて低温条件では ^{123}I -BMIPP の集積率が 0.28 倍に低下した。代謝活性を低下させたことで集積率が顕著に減少したことから、 ^{123}I -BMIPP の大腸菌 EC-14 株への集積は、細菌の増殖活性のみならず、代謝活性にも依存していることが示された。

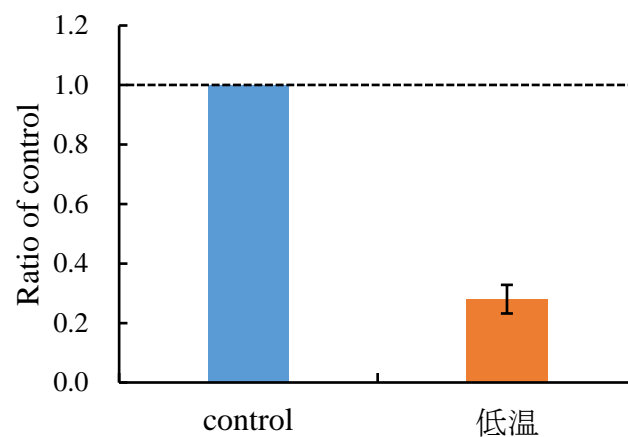


Fig. 2 低温条件での大腸菌 EC-14 株への ^{123}I -BMIPP の集積

III. 脂肪酸輸送系膜タンパクの阻害剤負荷条件での ^{123}I -BMIPP 集積実験

A) 検討方法

^{123}I -BMIPP は大腸菌 EC-14 株の代謝活性に依存して高集積を示すため、何らかの輸送系が関与していると考えられた。ヒト細胞においては、脂肪酸輸送系膜タンパクである CD36 や fatty-acid transport protein (FATP) が脂肪酸の取り込みに関与することが報告されている^{3,4)} ことから、これらの脂肪酸輸送系膜タンパクが大腸菌 EC-14 株の ^{123}I -BMIPP 取り込みにも関与するかを確認した。II と同様の条件で大腸菌 EC-14 株を前培養し、本培養にはアミノ酸不含 D-MEM 培地を用い、

37°Cで1時間（誘導期）、3時間（対数増殖期）、6時間（定常期）培養した後、 ^{123}I -BMIPPを37 kBq/10 μL 投与し、CD36の阻害剤 sulfosuccinimidyl oleate (SSO, Cayman chemical) と FATPの阻害剤 lipofermata (Cayman chemical) の2種類の脂肪酸輸送系膜タンパクの阻害剤をそれぞれ負荷した。その後、IIと同様の方法で大腸菌 EC-14 株に集積した放射能を測定して control と比較した。

B) 結果と考察

阻害剤負荷条件で集積実験を行った結果を Fig. 3 に示す。 ^{123}I -BMIPP の集積率は阻害剤を負荷していない control では培養時間1時間では3.05%、3時間では4.26%、6時間では3.85%となり、これらに対し、SSO負荷では減少し (Fig 3 (a))、lipofermata負荷では顕著に増加した (Fig 3 (b))。脂肪酸輸送系膜タンパクの阻害剤であるSSO負荷により集積率が減少したことから、大腸菌 EC-14 株への ^{123}I -BMIPP の集積には脂肪酸輸送系膜タンパク CD36 が関与していると考えられる。これに対し、同じく脂肪酸輸送系膜タンパク FATP の阻害剤である lipofermata 負荷により ^{123}I -BMIPP の集積率が増加したのは、lipofermata の抗菌活性を抑制する性質⁵⁾が大腸菌 EC-14 株に大きく働いたためであると考えられる。したがって脂肪酸輸送系膜タンパク FATP の ^{123}I -BMIPP 集積への寄与は認められなかった。

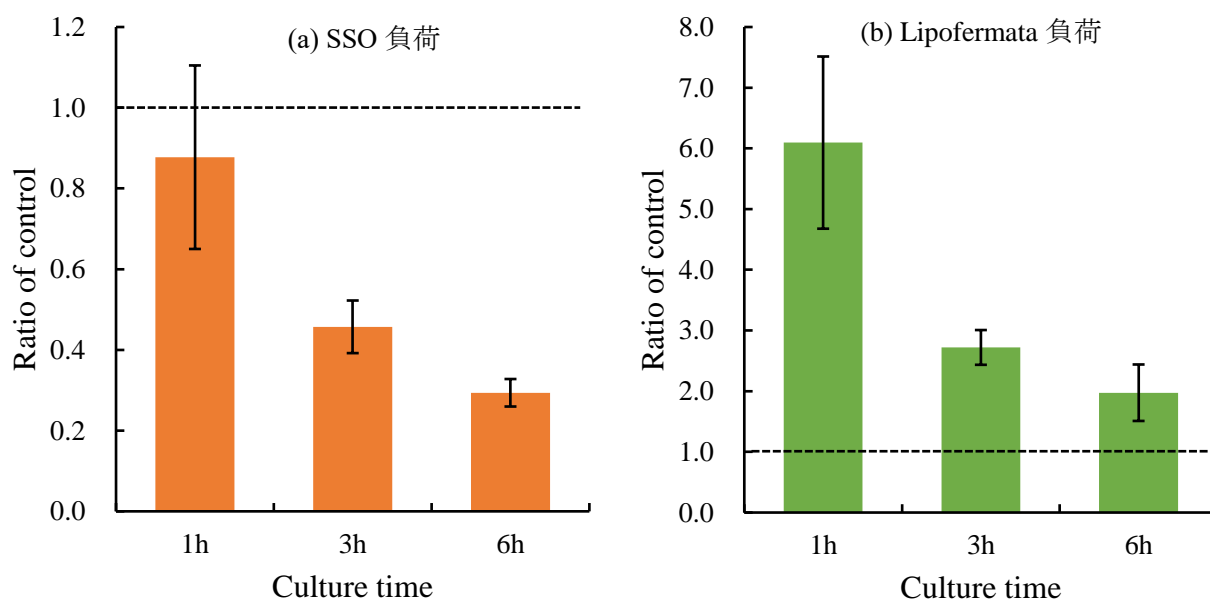


Fig. 3 脂肪酸輸送系膜タンパク阻害剤負荷条件での大腸菌 EC-14 株への ^{123}I -BMIPP の集積

IV. 弱酸性条件での ^{123}I -BMIPP 集積実験

A) 検討方法

一般的に細菌は糖を分解して酸を産生する⁶⁾ため、感染巣は弱酸性になると考えられる。そこで、3時間本培養した菌液の D-MEM 培地をヒト体液の pH 7.4 から *in vivo* の感染巣を想定した弱酸性 pH 5.0 に変化させた場合において、大腸菌 EC-14 株における ^{123}I -BMIPP 集積率を検討した。IIと同様の条件で大腸菌 EC-14 株を前培養し、本培養にはアミノ酸不含 D-MEM 培地を用い、37°C で3時間培養した後、菌液の D-MEM を pH 5.0 または pH 7.4 の緩衝液 (20 mM phosphate buffer, 5 mM 酢酸, 0.01 % tween80) のいずれかで置換し、 ^{123}I -BMIPP を 37 kBq/10 μL 投与して5分間取り込ませた後、IIと同様の方法で大腸菌 EC-14 株に集積した放射能を測定した。

B) 結果と考察

弱酸性条件で集積実験を行った結果を Fig. 4 に示す。通常の実験条件と同じ pH 7.4 とした control と比べて弱酸性条件では ^{123}I -BMIPP の集積率が 7.6 倍と顕著に増加した。このことから、 ^{123}I -BMIPP は体内の感染巣に近い環境下の細菌をより検出しやすいことを明らかにした。

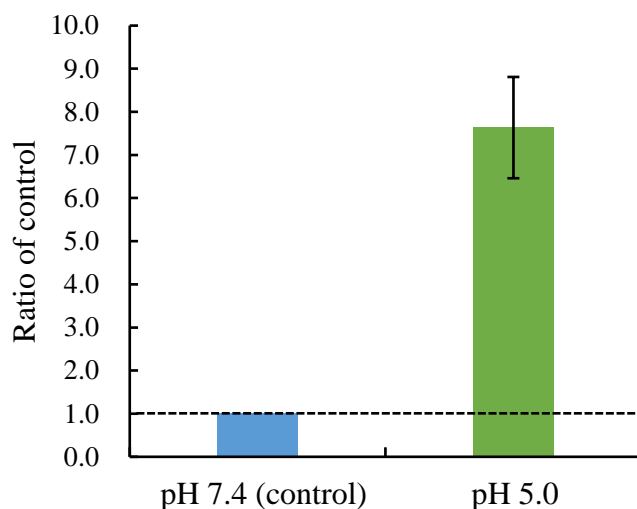


Fig. 4 弱酸性条件での大腸菌 EC-14 株への ^{123}I -BMIPP の集積

V. 結語

^{123}I -BMIPP の集積は大腸菌 EC-14 株の代謝活性を反映し、その集積機序には脂肪酸輸送系膜タンパク CD36 が関与していることを見出した。さらに、 ^{123}I -BMIPP の集積は体内の感染巣に近い環境下の細菌の検出に適していることを明らかにした。

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。

VII. 参考文献

- 1) 仲本 恒弥. SPECT用放射性医薬品を用いた細菌感染症早期画像診断の検討. 金沢大学医薬保健学域保健学類学士課程論文. 2019.
- 2) 村中 由佳. 細菌感染症早期診断を目的とした核医学画像診断薬の細菌集積性の検討. 金沢大学大学院医薬保健学総合研究科保健学専攻修士論文. 2020.
- 3) Zaoui M, Morel M, Ferrand N, et al. Breast-associated adipocytes secretome induce fatty acid uptake and invasiveness in breast cancer cells via CD36 independently of body mass index, menopausal status and mammary density. *Cancers*. 11(12): 2012.
- 4) Zhang M, Di Martino JS, Bowman RL, et al. Adipocyte-derived lipids mediate melanoma progression via FATP proteins. *Cancer Discov*. 8(8): 1006-1025; 2018.
- 5) Falconer SB, Reid-Yu SA, Gehrke SS, et al. Zinc chelation by a small-molecule adjuvant potentiates meropenem activity in vivo against NDM-1-producing klebsiella pneumoniae. *ACS Infect Dis*. 1(11): 533-543; 2015.
- 6) 松本 哲哉. 最新臨床検査学講座 臨床微生物学. 医歯薬出版株式会社. 16-19; 2019.