

病原性緑膿菌感染マウスを用いた 標識 methionine の細菌感染症診断薬としての有用性

山田 万梨

(指導教員：川井 恵一 教授、水谷 明日香 助教)

要旨：生活環境中に広く常在する緑膿菌は各種の抗菌薬に耐性を示す傾向が強く、免疫力が低下した患者にとって、院内感染などの日和見感染症の起原菌として問題になっている。そこで従来の細菌感染症診断法である細菌培養法に代わる新たな手法として、より迅速で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細菌感染症画像診断法の可能性を示してきた。本研究では、細菌の生命維持および増殖に必要な栄養素である天然アミノ酸の中から、既に脳腫瘍の PET 検査に使用されている [S-methyl-¹¹C]-L-methionine の応用を想定し、標識位置が同じ [S-methyl-³H]-L-methionine (³H-L-Met) およびその光学異性体である [S-methyl-³H]-D-methionine (³H-D-Met) の細菌感染症画像診断薬としての有用性を検討した。緑膿菌には臨床分離株であり病原性を有する SR24 株を使用した。予め免疫抑制処理を施したマウスの右腓腹筋に SR24 株を播種し、緑膿菌感染モデルを作成した。感染 2 時間と 8 時間に³H-L-Met または³H-D-Met を投与し、投与 15 分後と 60 分後に両側の腓腹筋を採取して重量集積率および感染側のコントラストを算出した。その結果、³H-D-Met では全ての条件において感染腓腹筋は非感染腓腹筋に対して重量集積率が有意に高く、³H-L-Met では感染 2 時間および感染 8 時間における RI 投与後 15 分で有意差を認めた。特に感染早期である感染 2 時間から RI 投与 15 分後において³H-D-Met で約 1.7、³H-L-Met で約 1.8 の高コントラストが得られた。以上より、感染早期かつ RI 投与後短時間で高いコントラストが得られたことから、¹¹C-L-Met、¹¹C-D-Met とともに緑膿菌感染症画像診断薬としての有用性が示された。

I. はじめに

水まわりなどの生活環境中に広く常在する緑膿菌は、各種の抗菌薬に耐性を示す傾向が強く、免疫力が低下した患者にとって日和見感染症の起原菌として問題となっている¹⁾。現在、臨床で一般的に行われている細菌感染症の診断には、患者から採取した検体中の細菌を染色し、染色像、菌体の大きさや形、配列の特徴などを顕微鏡で肉眼的に確認する塗抹染色検査、血液寒天培地などの数種類の寒天培地を用いて検体中の原因細菌を分離・培養する分離培養検査²⁾、次いで同定検査が行われる。しかし、原因細菌の同定までに最低 1 日以上と長時間を要することや、感染部位の特定が困難であることが問題点として挙げられている³⁾。そこで従来の診断法に代わる手法として、低侵襲かつ短時間で結果を得ることができ、全身画像で感染部位の特定や治療後のフォローアップへの応用も期待できる画像診断に着目した。本研究では細菌の生命維持および増殖に必要な栄養素の 1 つである天然アミノ酸⁴⁾の中から、既に脳腫瘍の PET 検査に使用されている [S-methyl-¹¹C]-L-methionine の応用を想定し、標識位置が同じ [S-methyl-³H]-L-methionine (³H-L-Met) およびその光学異性体である [S-methyl-³H]-D-methionine (³H-D-Met) の細菌感染症画像診断薬としての有用性を検討するため、緑膿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

緑膿菌の腓腹筋感染モデルマウスは本研究グループの先行研究⁵⁾を基に新たに作製した。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、病原性を有する緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* SR24 株を選択し、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 4 °C, 7000 rpm の条件下で 5 分間遠心分離し、菌体を回収後、生理食塩水 (大塚製薬) で懸濁した。懸濁液を生理食塩水でさらに希釈し、約 2.0×10^7 CFU/mL の菌液を作成した。実験動物には ICR マウス (5 週齢、雄、日本クレア) を使用し、免疫抑制剤として cyclophosphamide (富士フイルム和光純薬) を用いた。免疫抑制剤を感染 4 日前に 150 mg/kg、感染 1 日前に 100 mg/kg マウスの腹腔内へ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、塩酸メドミジン) 下で緑膿菌 SR24 株を右側の腓腹筋に一匹当たり 2.0×10^6 CFU/100 μ L 播種して腓腹筋感染モデルマウスを作製した。

また、感染部の菌数を測定することで作製した感染モデルマウスの感染が成立していることを確認した。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感染マウスの腓腹筋における菌数を算出した。その結果、Fig. 1 より感染 2 時間と感染 8 時間で菌数が 6.9 倍と十分に増殖していることが確認できたことから、播種後の感染時間には感染早期の 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。

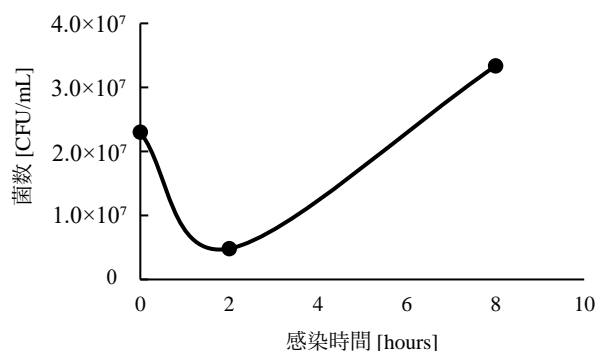


Fig. 1 SR24 株腓腹筋感染モデルマウスのコロニーカウント

III. 腓腹筋感染モデルマウスを用いた集積評価

(A) 検討方法

II に示した方法で作製した感染 2 時間と感染 8 時間の腓腹筋感染モデルマウス (各 $n = 4$) を用いて、標識アミノ酸 $^3\text{H-L-Met}$ と $^3\text{H-D-Met}$ の感染部位への集積を検討した。感染 2 時間と 8 時間の腓腹筋感染モデルマウスに 10 MBq/匹の $^3\text{H-L-Met}$, $^3\text{H-D-Met}$ を尾静脈から投与し、投与 15 分後と 60 分後にマウスを解剖して感染腓腹筋および対側の非感染腓腹筋を採取した。なお、腓腹筋感染モデルマウスは $^3\text{H-L/D-Met}$ 投与 4 時間前に絶食処置を施した。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) を添加して溶解した。その溶解液と液体シンチレーションカクテル (Ultima gold, PerkinElmer) 3.0 mL を混和し、過酸化水素 (Sigma-aldrich) を 600 μ L 添加して脱色した後、液体シンチレーションカウンター (LSC-8000, Aloka medical) で各組織に集積した放射能を測定した。式 (1) を用いて重量集積率を、式 (2) を用いて感染部位と非感染部位とのコントラスト (集積比) を算出することにより、 $^3\text{H-L/D-Met}$ の緑膿菌感染部位への集積性を評価した。

$$\text{重量集積率 [\%ID/g]} = \frac{\text{サンプルから得られた counts [cpm]}}{\text{投与した放射能の counts [cpm] / サンプルの重量 [g]}} \times 100 \dots (1)$$

$$\text{コントラスト (集積比)} = \frac{\text{感染腓腹筋の重量集積率 [\%ID/g]}}{\text{非感染腓腹筋の重量集積率 [\%ID/g]}} \dots (2)$$

(B) 結果と考察

Fig. 2 に³H-L-Met, Fig. 3 に³H-D-Met の感染 2 時間および感染 8 時間の RI 投与 15 分後と RI 投与 60 分後における重量集積率を示す。³H-L-Met では感染 2 時間および感染 8 時間マウスに対する RI 投与 15 分後において感染部位と非感染部位の重量集積率に有意水準 0.01 で有意差が認められた。³H-D-Met では感染 2 時間の RI 投与 15 分後および 60 分後、感染 8 時間の RI 投与 15 分後において有意水準 0.01 で有意差が認められ、感染 8 時間の RI 投与 60 分後において有意水準 0.05 で有意差が認められた。また、各条件における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 table 1 に示す。感染 2 時間の RI 投与 15 分後において³H-L-Met では 1.83, ³H-D-Met では 1.73 と高いコントラストが得られた。また、感染 2 時間の RI 投与 60 分後においても³H-L-Met, ³H-D-Met ともにコントラストが保たれた。一方、感染 8 時間では感染 2 時間と比較して³H-L-Met, ³H-D-Met ともに感染腓腹筋と非感染腓腹筋のコントラストが低下していた。これは菌が感染部から全身に拡散し、腓腹筋以外にも菌が分布したためであると考えられた。

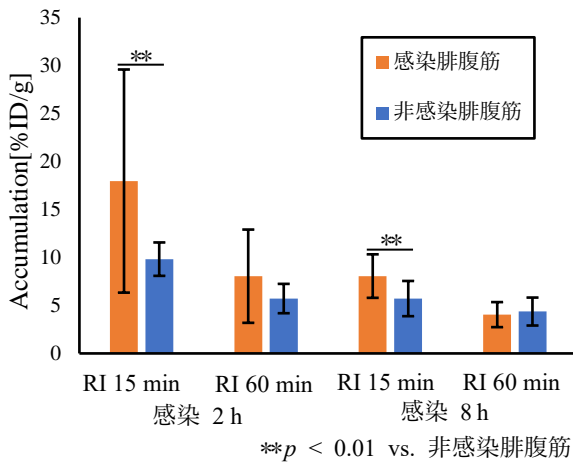


Fig. 2 ³H-L-Met の重量集積率

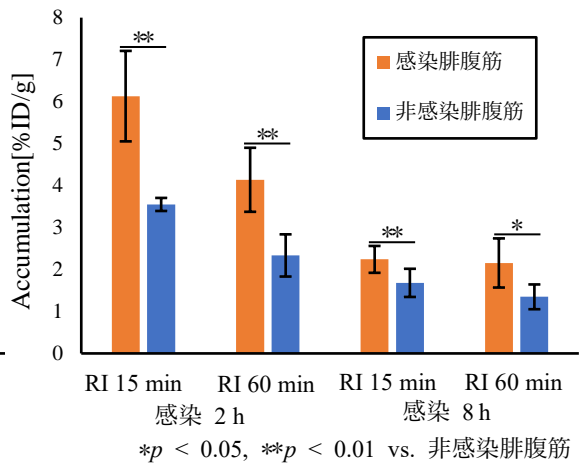


Fig. 3 ³H-D-Met の重量集積率

Table 1 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

感染	RI 投与	腓腹筋	³ H-L-Met		³ H-D-Met	
			%ID/g	Contrast	%ID/g	Contrast
2 時間	15 分	感染	18.0 ^{**}	1.83	6.13 ^{**}	1.73
		非感染	9.83		3.55	
	60 分	感染	8.05	1.41	4.14 ^{**}	1.77
		非感染	5.72		2.33	
8 時間	15 分	感染	8.06 ^{**}	1.41	2.24 ^{**}	1.33
		非感染	5.72		1.68	
	60 分	感染	4.05	0.93	2.16 [*]	1.60
		非感染	4.37		1.35	

p* < 0.05, *p* < 0.01 vs. 非感染腓腹筋

IV. 結語

$^3\text{H-L-Met}$, $^3\text{H-D-Met}$ どちらも感染早期かつ RI 投与後短時間において感染部位に高いコントラストが得られたことから、今回の実験で用いた $^3\text{H-L-Met}$, $^3\text{H-D-Met}$ と標識位置が同じである $^{14}\text{C-L-Met}$, $^{14}\text{C-D-Met}$ とともに緑膿菌感染症画像診断薬として有用であることが示された。

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、水谷明日香助教、川井研究室の方々に心より御礼申し上げます。

VII. 参考文献

- 1) 荒川 宜親. 薬剤耐性緑膿菌感染症とは. 国立感染症研究所. 2022.
薬剤耐性緑膿菌感染症とは (<https://www.niid.go.jp/niid/ja/kansennohanashi/2373-dr-pa-intro.html>)
- 2) 岡田 敦, 設楽 政次, 森田 耕司, 他. 微生物学/臨床微生物学 第3版. 医歯薬出版. pp.22-38; 2012.
- 3) Jain SK. Promise of molecular imaging in the study and treatment of infectious diseases. *Mol Imaging Biol.* 19(3): 341-347; 2017.
- 4) 山西 弘一, 平松 啓一, 中込 治. 標準微生物学 第9版. 医学書院. pp.72; 2005.
- 5) Muranaka Y, Mizutani A, Kobayashi M, *et al.* $^{123}\text{I-BMIPP}$, a radiopharmaceutical for myocardial fatty acid metabolism scintigraphy, could be utilized in bacterial infection imaging. *Pharmaceutics.* 14(5): 1008; 2022.