

## 緑膿菌への $^{123}\text{I}$ -BMIPP の代謝依存的集積の評価

直江哲周 (指導教員 川井恵一 教授, 水谷明日香 助教)

### I. はじめに

現在、細菌感染症の診断には細菌培養検査が一般的に用いられているが、培養に時間が必要であり、感染部位の詳細な位置は特定できない。そこで本研究室では、迅速に感染部位を特定できる新しい診断法として、放射性医薬品を用いた細菌感染症画像診断法の開発を検討してきた。これまでの研究により、数種の放射性医薬品が大腸菌などの細菌に対して高集積を示すことを明らかにし、その中でも 15-(4- $^{123}\text{I}$ -iodophenyl)-3(R,S)-methyl-penta-decanoic acid ( $^{123}\text{I}$ -BMIPP) が多くの菌種に対して高い集積を示した<sup>1,2)</sup>。一方、画像診断で感染部位を特定するためには細菌の活動性を反映する必要があるため、そのためには、細菌の代謝活性に依存した集積を評価することが重要であると考えた。そこで本研究では、代謝依存的に放射能が菌体内に取り込まれることを集積として定義し、さらに、代謝非依存的な要因により菌体の内外に放射能が吸着することを吸着、それらを合わせて移行とした。本研究では細菌の代謝活性を反映した画像診断の開発を目指し、 $^{123}\text{I}$ -BMIPP の細菌への移行における代謝依存的集積を評価することを目的とした。

### II. 実験材料

院内感染や日和見感染の代表的な原因菌である緑膿菌に着目し、PA01 株及び塩野義製薬株式会社から譲渡された臨床分離株である SR24 株を用いた。前々培養、前培養は Todd's hewitt broth (Becton, Dickinson and company) に 0.2 % yeast extract (Becton, Dickinson and company) を添加した THY 培地を用いて、37°C で 9 時間、14 時間振盪培養した。本培養はアミノ酸不含 Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM, 富士フイルム和光純薬) 培地を用いて各実験に合わせた温度、時間で本培養を行った。放射性医薬品には、核医学画像診断において心筋脂肪酸代謝シンチグラフィに用いられる  $^{123}\text{I}$ -BMIPP (日本メジフィジックス) を使用した。

### III. $^{123}\text{I}$ -BMIPP 移行率の経時的变化

#### (1) 実験方法

緑膿菌への  $^{123}\text{I}$ -BMIPP 移行が平衡に達するまでに必要な時間を確認するために、 $^{123}\text{I}$ -BMIPP を投与した後の振盪時間を変化させ、移行率の経時的变化を確認した。PA01 株及び SR24 株を緑膿菌が発育可能である 37°C と低温条件の 4°C で 1 時間本培養した後、菌液 990 $\mu\text{L}$  に  $^{123}\text{I}$ -BMIPP を 37kBq/10 $\mu\text{L}$  投与し、37°C, 4°C でそれぞれ 1, 5, 15, 30 分間振盪した。その後、7000G, 4°C で 10 分間遠心分離を行い、上清を除去したペレットをほぐして phosphate buffered saline (pH 7.4) (PBS, タカラ) を加えて洗浄し、再度遠心分離した。2 回洗浄した後、上清を除去して

ペレットをほぐし、0.1N NaOH (Nacalai tesque) を 1.0mL 加えることで菌体を溶解した。その後、オートウェルγカウンタ (AccuFLEX ARC-7010, Aloka medical) で放射能を測定し、投与した  $^{123}\text{I}$ -BMIPP の放射能に対する割合として緑膿菌への移行率を算出した。

## (2) 結果

$^{123}\text{I}$ -BMIPP 移行率の経時変化を Fig. 1 に示した。37°C培養では  $^{123}\text{I}$ -BMIPP 投与後の振盪時間が 1分から5分の間では移行率の増加が見られた。振盪時間が5分から15分の間においても移行率は依然増加した。しかし、振盪時間15分から30分の間では移行率の増加は緩やかになり、特に SR24 株ではほとんど増加しなかった。4°C培養における移行率は両菌株ともに常に 37°C培養における移行率より低い値であったが、37°C培養における移行率の5割~7割を占める高い移行率が確認された。

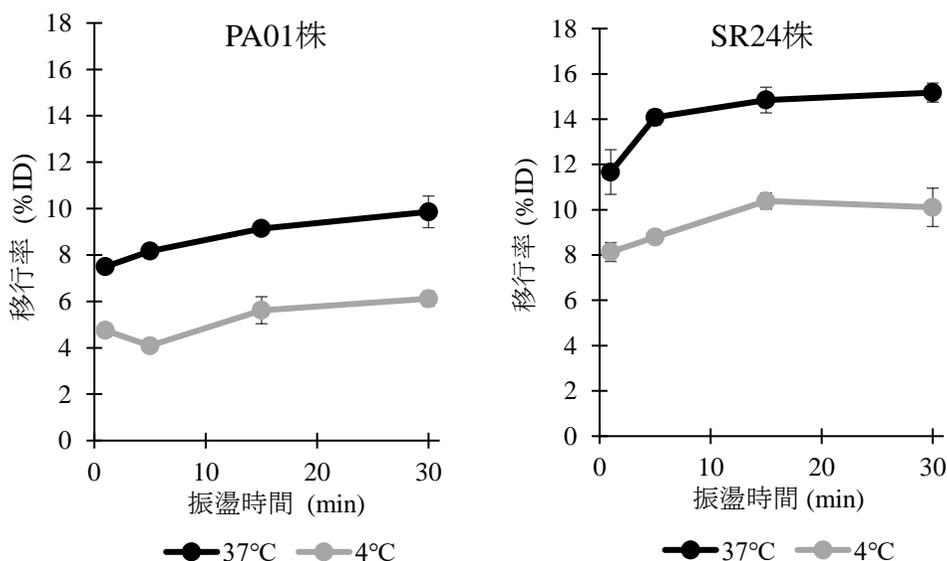


Fig. 1 PA01 株、SR24 株における  $^{123}\text{I}$ -BMIPP 移行率の経時変化

## (3) 考察

振盪時間 15 分から 30 分における緑膿菌への  $^{123}\text{I}$ -BMIPP 移行率の増加は緩やかであったことから、移行は 15 分で概ね平衡に達したと判断し、以降の実験では  $^{123}\text{I}$ -BMIPP 投与後の振盪時間は 15 分とした。また、SR24 株は PA01 株と比べて  $^{123}\text{I}$ -BMIPP の移行速度が速く、増殖速度など菌株間の増殖特性の違いを反映していると考えられる。緑膿菌は 4°C培養では発育できない<sup>3)</sup> など代謝活性が抑制されているにもかかわらず振盪 1 分から  $^{123}\text{I}$ -BMIPP の移行が確認されたことから、緑膿菌への  $^{123}\text{I}$ -BMIPP 移行には代謝に依存しない要因による移行、すなわち吸着が含まれていると考えられた。

#### IV. 代謝非依存的な吸着の影響の検討及び代謝依存的集積の評価

##### (1) 実験方法

IIIの結果から緑膿菌への<sup>123</sup>I-BMIPP移行には代謝に依存しない吸着が含まれている可能性が示された。そこで、代謝非依存的な吸着が移行率に与える影響の程度を確認し、緑膿菌への<sup>123</sup>I-BMIPPの移行における代謝依存的集積を評価した。緑膿菌 PA01 株及び SR24 株を代謝活性が維持される 37°Cと代謝が抑制される低温条件の 4°Cで本培養した。培養時間は、先行研究により得られた PA01 株、SR24 株の増殖曲線<sup>2)</sup>を参考に、培養開始時点と誘導期、対数増殖期、定常期に設定し、PA01 株は 0, 2, 6, 12 時間、SR24 株は 0, 1, 3, 6 時間とした。各時間まで培養した後、菌液 990μL に<sup>123</sup>I-BMIPP を 37kBq/10μL 投与した。37°C, 4°Cでそれぞれ 15 分間振盪した後、IIIと同様の方法で移行率を算出した。さらに、緑膿菌の代謝活性が抑制されている 4°C培養における移行は代謝非依存的な吸着であると考え、37°C培養における移行率から 4°C培養における移行率を差し引くことで吸着の影響を補正し、代謝依存的集積率を求めた。

##### (2) 結果

37°C, 4°C培養における PA01 株、SR24 株への<sup>123</sup>I-BMIPP 移行率を Fig. 2 に示した。グラフ全体が 37°C培養における移行率を表し、グラフの白色部分が吸着率 (4°C培養における移行率) を示す。37°C培養においては、両菌株とも誘導期から対数増殖期にかけて移行率が増加した。4°C培養においては、どちらの菌株にも移行率の増加傾向はほとんど見られず、ほぼ一定の移行率を維持した。この 4°C培養の移行率を吸着率として 37°C培養の移行率から差し引いたグラフの黒色部分が集積率であると考えた。

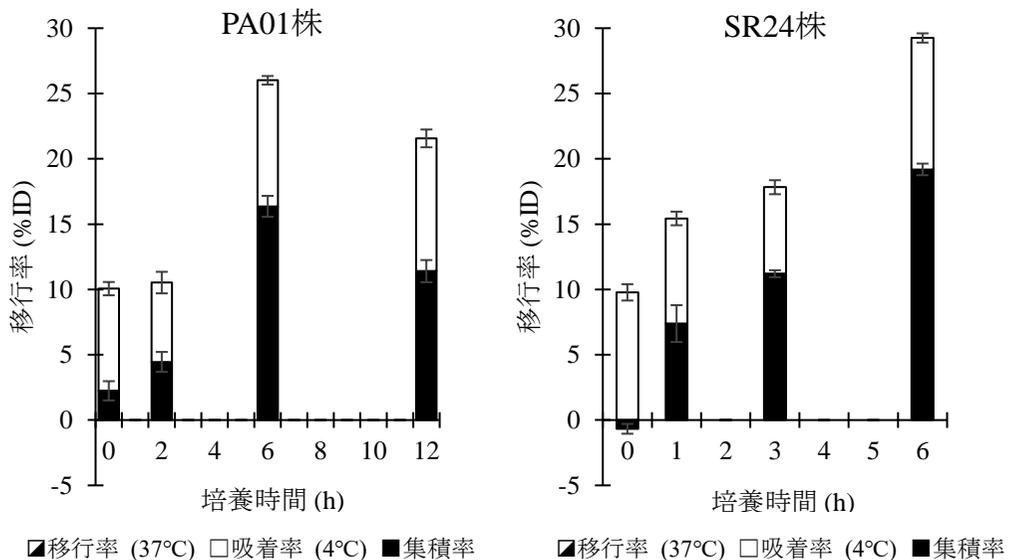


Fig. 2 PA01 株、SR24 株への<sup>123</sup>I-BMIPP 移行率、吸着率、集積率

吸着の影響を補正した代謝依存的集積率は誘導期から PA01 株で 4.5%、SR24 株で 7.4%の集積を確認でき、その後さらに増加し、PA01 株で 16.3%、SR24 株で 19.1%まで達した。

### (3) 考察

代謝活動が抑制されている 4°C培養においても培養時間に依存しない一定の移行が確認されたことから、緑膿菌への  $^{123}\text{I}$ -BMIPP の移行には代謝非依存的な吸着が関与していることが示された。血中遊離脂肪酸はヒトアルブミンや  $\alpha$ -ラクトアルブミンなど複数のタンパクとの結合が報告されており<sup>4,5)</sup>、類似した機序で細菌の持つ S 層タンパクに  $^{123}\text{I}$ -BMIPP が吸着したと考えた。また、37°C培養における移行率を吸着率で補正して得た代謝依存的集積率はどちらの菌株でも誘導期から 4.5~7.7%にもなり、その後 PA01 株では対数増殖期に 16.4%、SR24 株においては定常期に 19.2%もの顕著に高い集積を確認できた。

### V. 結語

緑膿菌 PA01 株及び SR24 株への  $^{123}\text{I}$ -BMIPP 移行には代謝非依存的な吸着が関わっていることが明らかになった。しかし、その影響を補正したところ、顕著な代謝依存的集積を確認できた。したがって、細菌の活動性を反映した緑膿菌感染症の画像診断に  $^{123}\text{I}$ -BMIPP を応用できる可能性が示された。

### 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、小林正和教授、水谷明日香助教、ご協力くださいました岡本研究室、本研究室の皆様にご心より御礼申し上げます。

### VII. 参考文献

- 1) 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.
- 2) 永井 有沙. 細菌感染症画像診断を目的とした緑膿菌と黄色ブドウ球菌への放射性医薬品集積評価. 金沢大学医薬保健学域保健学類学士課程論文, 2021.
- 3) 松本 哲也. 最新臨床検査学講座 臨床微生物学. 医歯薬出版株式会社, pp.169-171; 2020.
- 4) 高村 徳人, 他. 薬剤師に必要なタンパク結合置換術. 薬学雑誌, 127(11), 1805-1811; 2007.
- 5) Christel R. Brinkmann, Steffen Thiel, Daniel E. Otzen. Protein-fatty acid complexes: biochemistry, biophysics and function. *The FEBS Journal*, 280(8), 1733-1749; 2013.