

## 標識 methionine の細菌感染症鑑別診断の可能性

佐藤優希 (指導教員 川井恵一 教授、水谷明日香 助教)

### [はじめに]

現在、臨床で行われている細菌感染症の鑑別診断には一般的に細菌培養法が用いられているが、培養に時間が必要であり、感染部位の位置を特定するには適していない。そこで本研究室では、迅速に感染部位を特定できる新たな診断法として、放射性医薬品を用いた細菌感染症画像診断法を検討してきた。細菌感染症画像診断法は、非侵襲的で比較的時間がかからないといった利点があることに加えて、全身撮像により感染部位の特定が可能であり、経時的に撮像することで治療後のフォローアップに用いることも期待できる。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 検査に用いられている[S-methyl-<sup>11</sup>C]-L-methionine の応用を想定し、標識位置が同様に S メチル基である[S-methyl-<sup>3</sup>H]-L-methionine (<sup>3</sup>H-L-Met)、およびその光学異性体である[S-methyl-<sup>3</sup>H]-D-methionine (<sup>3</sup>H-D-Met) を選択した。また、画像診断で感染部位を特定するためには細菌の活動を反映する必要がある<sup>1)</sup>、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、対数増殖期における各菌株に対する<sup>3</sup>H-L-Met および<sup>3</sup>H-D-Met の集積性を菌種、菌株間で比較し、また当研究室で過去に行ったヒト表皮角化細胞 HaCaT 細胞への集積<sup>2)</sup>と比較することで正常ヒト細胞と細菌感染部の集積差から細菌感染症画像診断の可能性を検討した。

### [実験材料]

薬剤耐性や院内感染、劇症型などが問題となっている緑膿菌、黄色ブドウ球菌、レンサ球菌に着目し、緑膿菌 SR24 株、ATCC29260 株と黄色ブドウ球菌 ATCC13709 株、ATCC29213 株、レンサ球菌 M1-476 株、TPCH-F37 株を選択した。なお、緑膿菌 SR24 株、レンサ球菌 M1-476 株、TPCH-F37 株は譲渡された臨床分離株である。前々培養、前培養としてレンサ球菌は brain-heart infusion broth (Becton, Dickinson and company) 培地に、緑膿菌と黄色ブドウ球菌は 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、それぞれ 37°C で前々培養は 9 時間、前培養は 14 時間培養した。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時間で本培養を行った。放射性医薬品には、脳腫瘍の PET 検査に用いられている<sup>11</sup>C-L-Met への応用を考え、<sup>3</sup>H-L-Met およびその光学異性体で<sup>3</sup>H-L-Met と同様に S メチル基を<sup>11</sup>C で標識可能な<sup>3</sup>H-D-Met を用いた。

## I. 対数増殖期における標識 Met 集積率

### (A) 方法

はじめに、緑膿菌、黄色ブドウ球菌、レンサ球菌を本培養し、1 時間ごとに濁度を測定して増殖曲線を得た (Fig. 1)。増殖曲線から菌の増殖活性が最も高い対数増殖期として、緑膿菌 SR24 株では 3 時間、緑膿菌 ATCC29260 株と黄色ブドウ球菌、レンサ球菌では 5 時間を対数増殖期として選択した。

各菌株を対数増殖期まで培養した菌液 990 μL に<sup>3</sup>H-L-Met、<sup>3</sup>H-D-Met を 9.25 kBq/10 μL 投与して 37°C の恒温槽で穏やかに浸透しながら 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 回洗浄作業を行った後、上清を除去してペレットをほぐし、0.1 N NaOH (Nacalai tesque) を 1.0 mL 添加して菌体を溶解した後、各菌株に集積した放射能を液体シンチレーショ

ンカウンタ (LSC-5100, Aloka medical) で測定した。また、有意な集積が認められた菌株に対しては、標識 Met の取り込み機序を追加して検討した。標識 Met が菌体表面への吸着ではなく菌体内へ取り込まれていることを確認するため、本培養した菌液を 80°C で 30 分加熱処理した菌液と、標識 Met 集積の代謝依存性を確認するために、本培養した菌液を 4°C まで氷冷して代謝活性を低下させた菌液において、上記と同様に集積率を測定した。

(B) 結果と考察

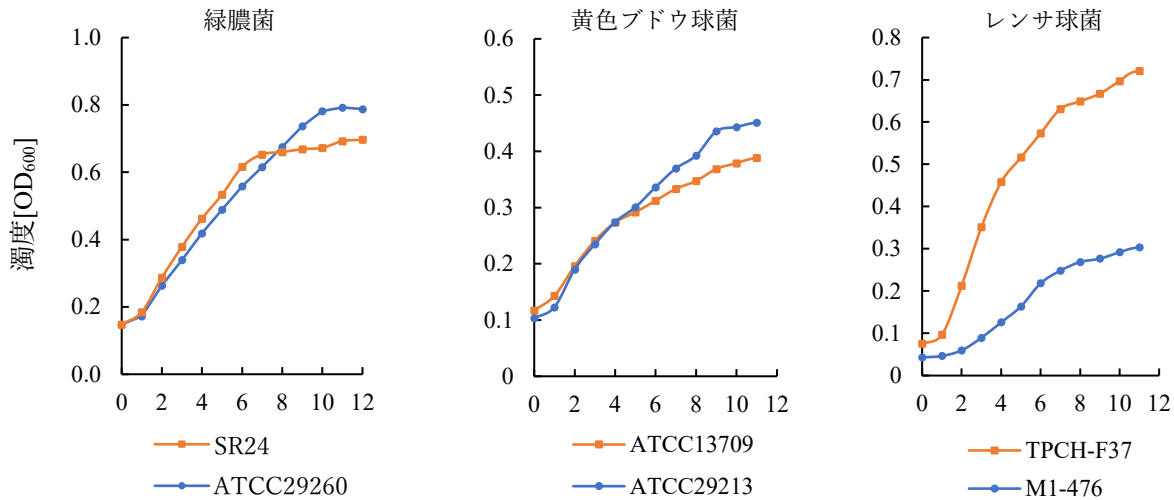


Fig. 1 : 緑膿菌、黄色ブドウ球菌、レンサ球菌の増殖曲線

緑膿菌、黄色ブドウ球菌、レンサ球菌での対数増殖期における標識 Met 集積率の結果を Fig. 2 に示す。全ての菌株において天然アミノ酸である L-Met がその光学異性体である D-Met よりも高く集積した。また、各細菌への集積率が緑膿菌、黄色ブドウ球菌では高集積であったのに対し、レンサ球菌では  $^3\text{H-L-Met}$ 、 $^3\text{H-D-Met}$  共に有意な集積が認められなかったことから、標識 Met を菌種の鑑別に用いることができる可能性が示された。なお、本検討でレンサ球菌には有意な集積が認められなかったことから、以降の熱処理・低温条件での検討は緑膿菌、黄色ブドウ球菌のみで実施した。

緑膿菌、黄色ブドウ球菌で検討した熱処理・低温条件での結果を Fig. 3 に示す。菌液の加熱処理は、通常条件での取り込みと比較することで菌体表面への吸着の有無を確認するために行った。検討した

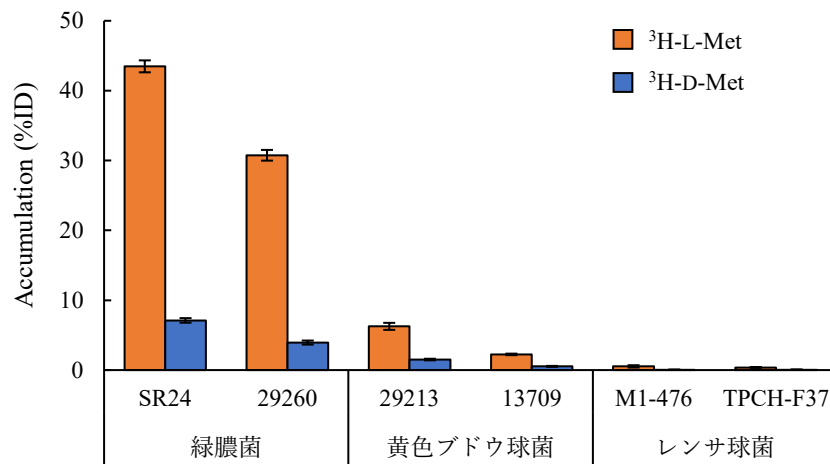


Fig. 2 : 対数増殖期における標識 Met 集積率 [%ID]

4 菌株すべてにおいて 37°Cでの通常取り込みと比較して、加熱処理によって  $^3\text{H-L-Met}$ 、 $^3\text{H-D-Met}$  共に集積率が 96%以上低下した。このことから緑膿菌、黄色ブドウ球菌の両菌株への標識 Met の集積は菌体表面への吸着ではないことが示された。また、80°C30 分の加熱処理は殺菌効果を有することから、緑膿菌、黄色ブドウ球菌への標識 Met 集積には生命活動が関与することが明らかになった。

4°Cの低温条件下においては 37°Cでの通常取り込みと比較して、緑膿菌では  $^3\text{H-L-Met}$ 、 $^3\text{H-D-Met}$  共に 95%以上集積が低下した。一方、黄色ブドウ球菌では  $^3\text{H-L-Met}$  で 82%の低下、 $^3\text{H-D-Met}$  で 67%の低下が確認された。このことから、緑膿菌への標識 Met の集積がほぼ代謝活性に依存したものであるのに対し、黄色ブドウ球菌では約 20-30%の集積が代謝に依存しない機序によるものであることが示された。

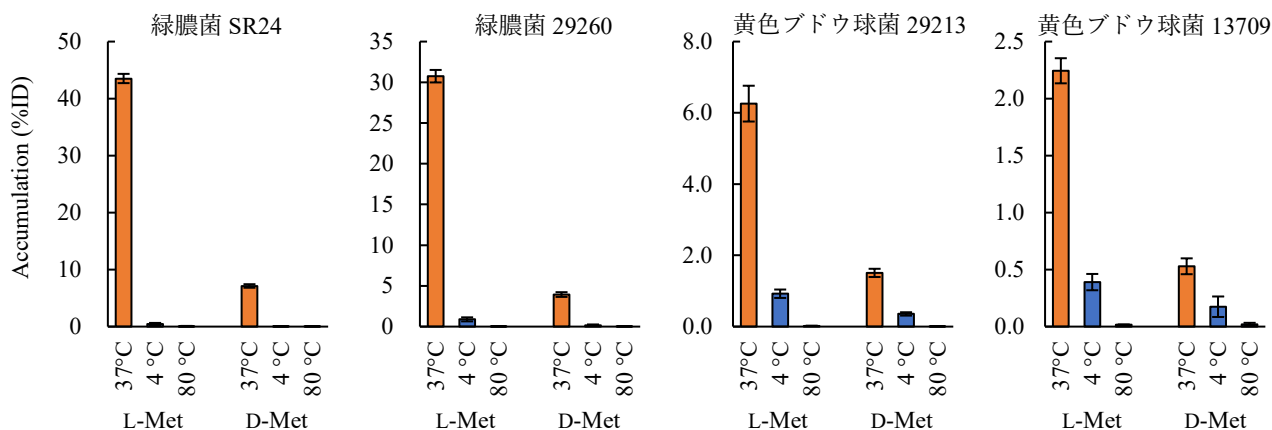


Fig. 3 : 熱処理・低温条件下における標識アミノ酸集積率 [%ID]

## II. Met 集積率の取り込み時間依存性と蛋白組込み率

### (A) 方法

標識 Met の集積が確認できた ATCC 株のうち、対数増殖期まで本培養した緑膿菌 29260 株、および黄色ブドウ球菌 29213 株に対して、I.と同様の方法で取り込み時間を 5 分、30 分、60 分と変化させた場合の標識 Met の集積率、および蛋白組込み率を測定した。蛋白組込み率の測定は、集積率検討と同様の手順で溶解した菌液から 190  $\mu\text{L}$  分取し、最終濃度 5%となるようにトリクロロ酢酸 (Nacalai tesque) を 10  $\mu\text{L}$  加えて蛋白を沈殿させた。この菌液 180  $\mu\text{L}$  をガラスフィルター (GC-50, Advantec) に捕集し、5%トリクロロ酢酸を含む氷冷 PBS でフィルターを 3 回洗浄し、100°Cに加熱乾燥させて蛋白を固定することで蛋白に組込まれた放射能を測定した。集積率と蛋白組込み率は、本研究室で過去に検討したヒト表皮角化細胞 HaCaT 細胞と比較した。

### (B) 結果と考察

結果を Fig. 4 に示す。HaCaT 細胞では、 $^3\text{H-L-Met}$ 、 $^3\text{H-D-Met}$  共に取り込み時間の経過によって集積率が増加したが、蛋白組込み率は天然アミノ酸である L-Met が徐々に高くなるのに対し、光学異性体である D-Met は取り込み時間によらず蛋白組込み率はほぼ一定であった<sup>1)</sup>。

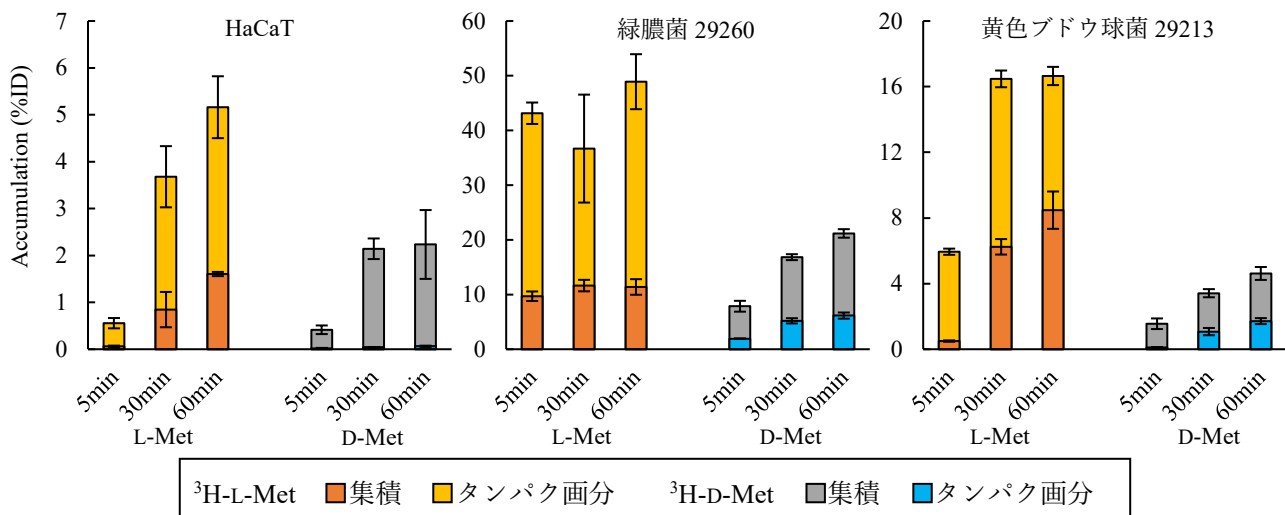


Fig.4：取込み時間を変化させた標識 Met 集積率 [%ID]

これに対し、緑膿菌 29260 株では <sup>3</sup>H-L-Met、<sup>3</sup>H-D-Met 共に非常に高い集積を示した。<sup>3</sup>H-L-Met では早期から高集積、高い蛋白組込み率が認められ、取込み時間によらず一定であった。<sup>3</sup>H-D-Met は取込み時間が長いほど細菌への集積量が高くなったが、蛋白組込み率は常にほぼ一定であった。また黄色ブドウ球菌 29213 株においても同様に、<sup>3</sup>H-L-Met、<sup>3</sup>H-D-Met 共に HaCat 細胞よりも高い集積を示し、取込み時間を長くするほど細菌への集積量が増加して蛋白組込み率も増加した。緑膿菌 29260 株と同様に光学異性体である <sup>3</sup>H-D-Met を蛋白に組込んでおり、黄色ブドウ球菌 29213 株では Met の蛋白組込み率が高いほど集積率が高くなる傾向が示された。緑膿菌と黄色ブドウ球菌においては、HaCaT 細胞との比較により光学異性体である D-Met は細菌特異的に蛋白に組込まれることから、画像化においてはヒト細胞との細菌感染部の集積差が期待できることが考えられた。これは細菌ではアミノ酸ラセマーゼを利用して <sup>3</sup>H-D-Met を <sup>3</sup>H-L-Met に可逆的に変換して代謝に用いている<sup>3)</sup>ためであると考えられる。また、L-Met、D-Met の集積については、緑膿菌 29260 株では取込み早期から非常に高い集積が認められ、黄色ブドウ球菌 29213 株では次第に集積が増加したことから、経時的に撮像することで緑膿菌と黄色ブドウ球菌を鑑別できる可能性が示された。

#### [結語]

細菌への集積量や集積速度を評価することで、感染部位の特定や鑑別診断において <sup>11</sup>C-L/D-Met が細菌感染症画像診断に応用できる可能性が示された。

#### [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、川井研究室の方々に心より感謝申し上げます。

#### [参考文献]

- 1) Muranaka Y, Matsue M, Mizutani A, et al. Evaluation of L-alanine metabolism in bacteria and whole-body distribution with bacterial infection model mice. *Int J Mol Sci.* 2022, 24(5):4775.
- 2) Muranaka Y, Mizutani A, Kobayashi M, et al. Comparison of L- and D-amino acids for bacterial imaging at lung infection mouse model. *Int J Mol Sci.* 23(5): 2467.
- 3) Radkov AD, Moe LA. Bacterial synthesis of D-amino acids. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014, 98(12):5363-5374.