

[はじめに]

現在の細菌感染症の診断には、一般的に細菌培養法が用いられている。細菌培養法では患者から採取した検体を分離培養し、得られたコロニーを塗抹染色や確認試験を行うことで原因菌を同定している。このため、劇症化のリスクや周囲への感染のリスクなどの観点から迅速な診断が求められているにも関わらず、多くの菌種の同定において診断までに24時間以上かかることが課題となっている。そこで、従来の培養法と比較して短時間で細菌感染部位の特定が容易な新たな診断法として、細菌感染症画像診断法が有用である。本研究室では、入手や臨床使用の容易さの観点から、すでに臨床で使用されている放射性医薬品の応用が有用であると考え、院内感染や薬剤耐性において問題になっている大腸菌 (*E.coli*) や黄色ブドウ球菌 (*S.aureus*)、緑膿菌 (*P.aeruginosa*) などの細菌感染症を診断する画像診断薬の探索として、現在臨床で使用されている ^{18}F -2-fluoro-2-deoxy-D-glucose (^{18}F -FDG) や $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 製剤、 ^{123}I 製剤、 ^{67}Ga など多数の放射性医薬品の細菌集積率を測定する集積スクリーニングを行ってきた。その結果、複数の放射性医薬品が特定の細菌に集積することが確認でき、集積した放射性医薬品の一部は菌種または菌株に特有の集積を示した。

そこで本研究では、新たな検討対象の菌種として様々な疾患を引き起こし、重症化による死亡率が問題となっているレンサ球菌 (Genus *Streptococcus*) を選択し、レンサ球菌感染症を診断する画像診断薬の探索として放射性医薬品の集積性の検討を行った。

[方法]

検討対象の菌株には、劇症型溶血性レンサ球菌感染症などにおいて診断の迅速性が求められているレンサ球菌¹⁾から、*S.pyogenes* の M1-476 と *S.dysgalactiae* の TPCH-F37 の2株を選択した。まず、2.0 mL の brain-heart infusion broth (Becton, Dickinson and company) 培地に凍結保存したストック菌液を 20 μL ずつ播種して 14 h 前培養した。次に、15 mL のアミノ酸不含 Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM, 富士フイルム和光純薬) に M1-476 の前培養液は 900 μL 、TPCH-F37 の前培養液は 600 μL 入れ、37°C の恒温槽で震盪して本培養を行った。本研究では、それぞれの菌株での増殖活性と放射性医薬品の集積量の関連性を調べるため、濁度を指標とした菌株ごとの増殖曲線を取得した (Fig. 1)。その結果、両菌株は類似した増殖曲線を示し、放射性医薬品の集積を検討するタイムポイントには、誘導期の 1 h、対数増殖期の 5 h、定常期の 10 h に設定した。

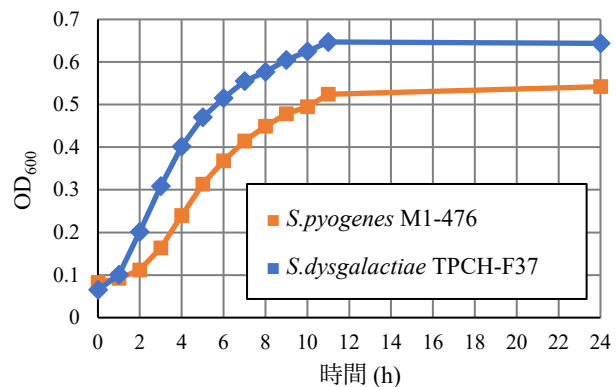


Fig. 1: レンサ球菌の増殖曲線

(A) ^{18}F -FDG の集積検討

PET 製剤である ^{18}F -FDG は、これまで大腸菌 (*E.coli*) や黄色ブドウ球菌 (*S.aureus*)²⁾、緑膿菌 (*P.aeruginosa*) などに対する感染症イメージングの研究が活発に行われていることから、本研究では新たにレンサ球菌 (Genus *Streptococcus*) に対する集積性を検討した。なお、 ^{18}F -FDG はブドウ糖類似物質であり、D-MEM 培地に含まれる D-glucose と競合することから、従来 4.5 g/L の D-glucose が含ま

れている D-MEM 培地を phosphate buffered saline (pH7.4) (PBS, タカラ) で希釈し、グルコース濃度を 1.0 g/L、0.1 g/L に低下させた培地を本培養および集積検討に使用した。

それぞれのタイムポイントまで培養した各菌株を 990 μ L ずつ分注し、 ^{18}F -FDG を 37 kBq/10 μ L ずつ添加して、5 分間 37°C の恒温槽で震盪しながら ^{18}F -FDG を取り込ませた。震盪後、4°C、7000 G、10 分間遠心分離し、PBS で 2 回洗浄操作を行い、0.1 N NaOH (Nacalai tesque) を 1.0 mL 添加して溶解したサンプルから 500 μ L 分注して γ カウンター (AccuFLEX ARC-8001, Aloka medical) で放射能を測定した。

また、後述する菌数の影響を検討した追加実験では、4.5 g/L の D-glucose が含まれた D-MEM 培地で各タイムポイントまで培養した菌株を分注する前に遠心分離し、上清を捨てて PBS に置換した。この菌液を PBS で 1/2、1/10 濃度に希釈し、菌数を変化させた 3 条件で検討を行った。その後の手順は上記と同じである。

(B) SPECT 製剤の集積検討

臨床で一般的に使用される SPECT 製剤 15 種類を対象にレンサ球菌に対する集積性を検討した。4.5 g/L の D-glucose が含まれた D-MEM 培地でそれぞれのタイムポイントまで培養した各菌株を 990 μ L ずつ分注し、SPECT 製剤を 37 kBq/10 μ L ずつ添加して、5 分間 37°C の恒温槽で震盪しながら取り込ませた。震盪後、4°C、7000 rpm、10 分間の遠心条件で PBS で 2 回洗浄操作を行い、0.1 N NaOH を 1.0 mL 添加して溶解したサンプルから 500 μ L 分注し、 γ カウンター (AccuFLEX ARC-7010, Aloka medical) で放射能を測定した。

[結果と考察]

(A) ^{18}F -FDG の集積検討

グルコース濃度が 4.5 g/L である希釈前の D-MEM 培地では、いずれの時間も ^{18}F -FDG の集積が認められず、グルコース濃度 1.0 g/L のときに TPCH-F37 の培養後 5 h と 10 h、M1-476 の 10 h で最も集積率が大きくなった (Fig. 2(A), (B))。本研究室で過去に検討を行った黄色ブドウ球菌 (*S.aureus*) SR3637 ほか 1 株での ^{18}F -FDG 集積の結果 (Fig. 2(C)) ではグルコース濃度が最も低い 0.1 g/L の条件で最も高い集積が認められていた。希釈により培地の養分が減ることでグルコース濃度が低い条件の方が菌の増殖が少なくなるはずであり、菌数の影響を考え追加実験を行ったところ、菌数に依存した ^{18}F -FDG の集積が認められた (Fig. 3)。このことから、 ^{18}F -FDG の集積はグルコース濃度だけでなく、菌数にも大きく影響を受けることが示された。

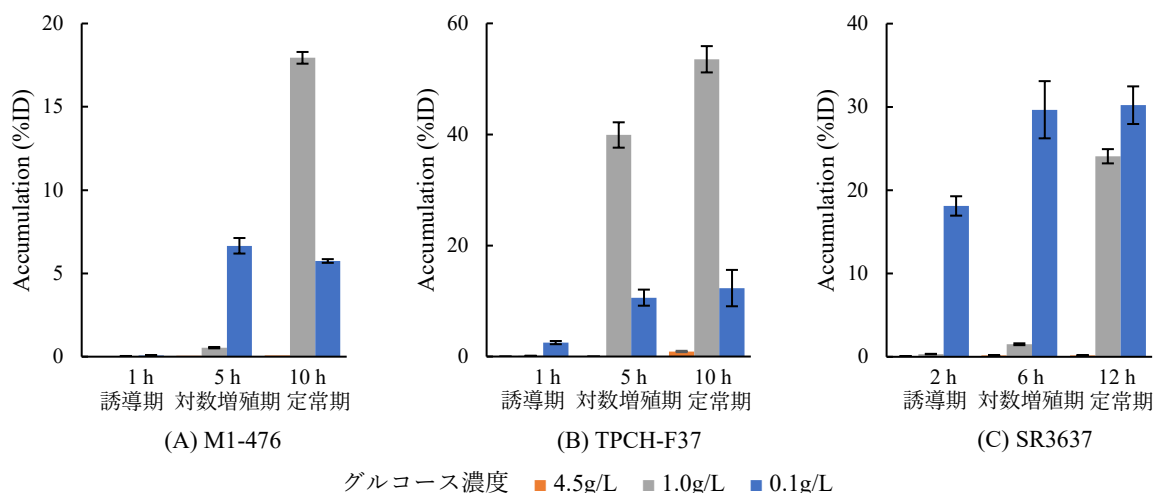


Fig. 2: ^{18}F -FDG の集積

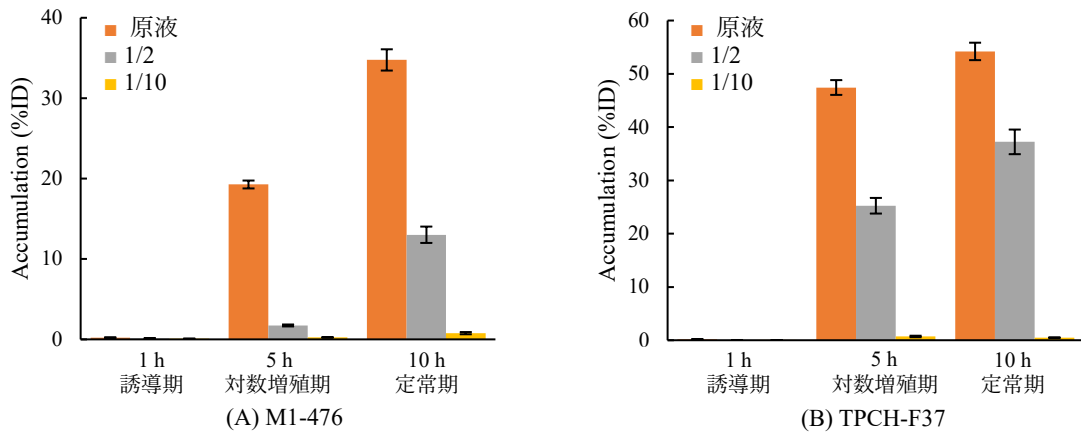


Fig. 3: ¹⁸F-FDG の集積 (菌数依存性)

(B) SPECT 製剤の集積検討

今回検討を行った SPECT 製剤のうち ^{99m}Tc-MAA、¹²³I-BMIPP、^{99m}Tc-フチン酸、^{99m}Tc-MIBG で特徴的な集積傾向が認められた。²⁰¹TiCl₄、^{99m}Tc-MDP、¹²³I-IFP、^{99m}Tc-TF、^{99m}Tc-PYP、^{99m}TcO₄⁻、⁶⁷Ga、^{99m}Tc-DTPA、^{99m}Tc-ECD、^{99m}Tc-MIBI、¹¹¹In-ペンテトレオチドではいずれの菌株でも有意な集積は認められなかった。

^{99m}Tc-MAA では M1-476 と TPCH-F37 のいずれにおいても全てのタイムポイントで 40%ID 以上の集積率が認められた (Fig. 4(A))。 ^{99m}Tc-MAA は大腸菌 (*E.coli*) や黄色ブドウ球菌 (*S.aureus*)、緑膿菌 (*P.aeruginosa*) などの他の菌種でも同様に高い集積を示していた。また、培地のグルコース濃度を低下させた条件で最も高集積を示した ¹⁸F-FDG の集積率 (Fig. 4(B)) と比較しても、いずれの条件でも ^{99m}Tc-MAA が倍近い高集積を示した。このことから ^{99m}Tc-MAA は、大腸菌などの他の菌種³⁾や菌株、タイムポイントによらず安定して ¹⁸F-FDG よりも高い集積が得られることが明らかとなり、¹⁸F-FDG と同様に細菌感染症画像診断に応用できる可能性が高いと考えられた。

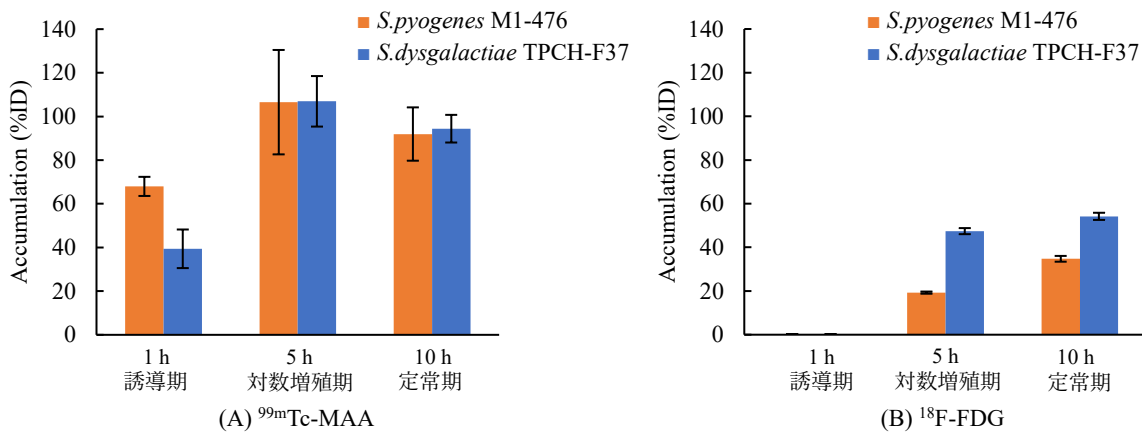


Fig. 4: ^{99m}Tc-MAA と ¹⁸F-FDG の集積

¹²³I-BMIPP では M1-476 と TPCH-F37 のいずれも菌の増殖に伴って集積が増加していた (Fig. 5)。菌株によらず安定した集積が得られることが明らかとなり、細菌感染症イメージングとして特定の部位や全身を撮影することで、増殖活性や菌数を反映した集積を示し、感染部位を特定できる可能性が示された。

^{99m}Tc-フチン酸での集積は ^{99m}Tc-MAA や ¹²³I-BMIPP と比較すると低値であったが、M1-476、TPCH-F37 で異なる集積が認められた (Fig. 6)。M1-476 では過去に検討した黄色ブドウ球菌 (*S.aureus*) 2 株、緑膿菌 (*P.aeruginosa*) 2 株と同様に増殖に伴って集積が増加したのに対し、TPCH-F37 では増殖に伴う変化は認められず、集積が一定であった。*S.pyogenes* M1-476 と *S.dysgalactiae* TPCH-F37 の 2 菌株で集積傾向に違いが認められたことから、*S.pyogenes* と *S.dysgalactiae* を鑑別できる可能性が示された。

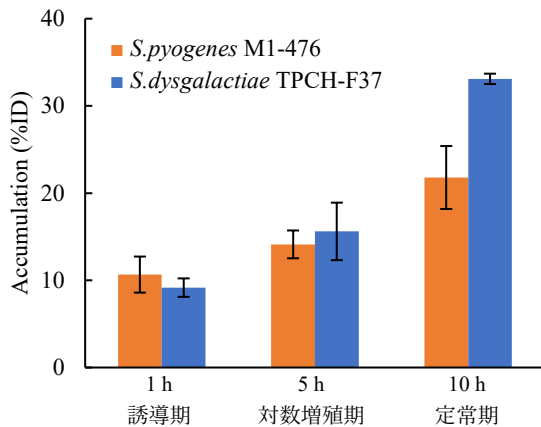


Fig. 5: ¹²³I-BMIPP の集積

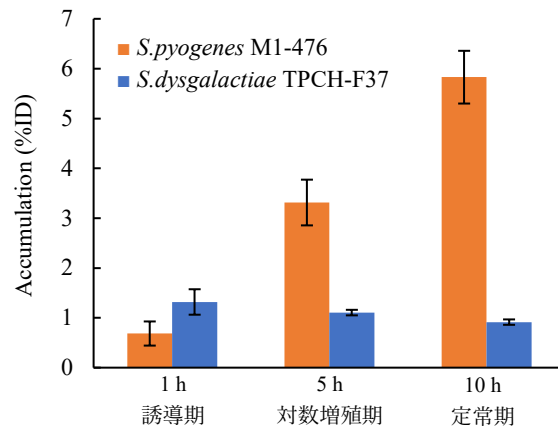


Fig. 6: ^{99m}Tc-フチン酸の集積

^{99m}Tc-MIBG では ^{99m}Tc-フチン酸と類似した結果が認められた (Fig. 7)。M1-476 では増殖に伴って集積率が増加したのに対し、TPCH-F37 では有意な集積は認められなかった。また、これまでに検討を行った黄色ブドウ球菌 (*S.aureus*) SR3637 ほか 2 株、緑膿菌 (*P.aeruginosa*) PA01 ほか 2 株でも有意な集積は認められず、レンサ球菌 *S.pyogenes* M1-476 でのみ有意な集積が認められたことから、他の菌種とレンサ球菌の *S.pyogenes* を鑑別できる可能性が示された。

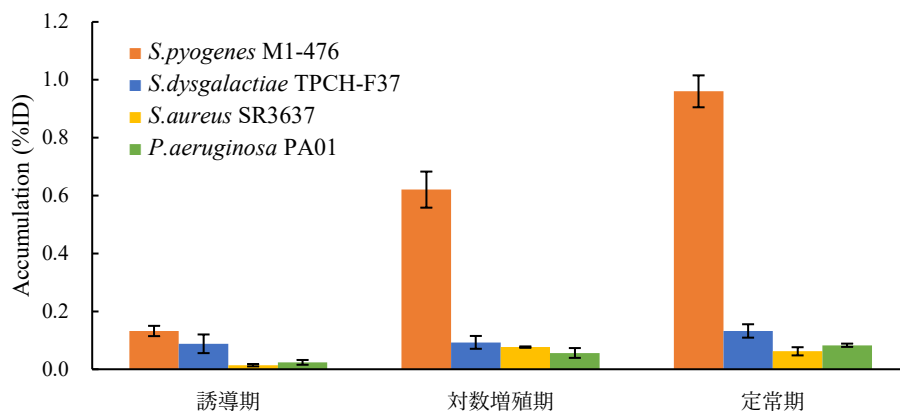


Fig. 7: ^{99m}Tc-MIBG の集積

[結語]

レンサ球菌の 2 菌株、*S.pyogenes* M1-476 と *S.dysgalactiae* TPCH-F37 において ¹⁸F-FDG と SPECT 製剤の特徴的な集積傾向が確認できた。よって、レンサ球菌においても細菌感染症の画像診断において SPECT 製剤を応用でき、感染部位の特定のみならず、菌種、菌株間の鑑別診断に繋が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) 松本哲也編集 臨床微生物学 医歯薬出版株式会社 2017 年 p112~115
- 2) Ghanem-Zoubi N, Kagna O, Abu-Elhija J, et al. Integration of FDG-PET/CT in the diagnostic workup for staphylococcus aureus bacteremia: a prospective interventional matched-cohort study. *Clin Infect Dis.* 2021, 73(11): e3859-e3866.
- 3) Muranaka Y, Mizutani A, Kobayashi M, et al. ¹²³I-BMIPP, a radiopharmaceutical for myocardial fatty acid metabolism scintigraphy, could be utilized in bacterial infection imaging. *Pharmaceutics*, 2022, 14(5): 1008.