

2407 非結核性抗酸菌症に対する ^{99m}Tc -GSA 集積機序の評価

北川 実祐

(指導教員:川井 恵一 教授、水谷 明日香 助教)

要旨:非結核性抗酸菌の細胞壁は、脂質成分が約 60 %を占めるなど特徴的な層状構造になっており、他の菌種に比べて発育に時間を要する。本研究室で、近年罹患率が増加している非結核性抗酸菌症の核医学画像診断への応用を検討した結果、肝受容体シンチグラフィ製剤 ^{99m}Tc -DTPA-galactosyl-human serum albumin (^{99m}Tc -GSA) が非結核性抗酸菌の約 90 %を占める *Mycobacterium avium complex* (MAC) に高集積を示すことを確認した。本研究では、非結核性抗酸菌症の核医学画像診断を目的として、MAC への ^{99m}Tc -GSA 集積機序について評価した。まず、MAC への ^{99m}Tc -GSA の経時的な取り込みを検討した。また、MAC に対して代謝活性を低下させるための氷冷処理および殺菌作用のある加熱処理条件、さらに、ヒトの肝細胞において ^{99m}Tc -GSA が結合するヒトアジアロ糖タンパク受容体 (h-ASGP-R) の競合阻害剤である asialofetuin を負荷した条件による、 ^{99m}Tc -GSA の集積への影響を検討した。 ^{99m}Tc -GSA の MAC への集積は 2 hr まで徐々に増加することが確認された。また、37 °C での集積率と比較して加熱処理では集積率が顕著に低下したが、氷冷処理では低下しなかったことから、 ^{99m}Tc -GSA は死菌には集積せず、エネルギーに依存しない集積機序が関与していると考えられた。さらに、asialofetuin 負荷において阻害剤濃度に依存した顕著な集積低下が見られたことから、MAC にはヒト肝細胞の h-ASGP-R に相同する asialofetuin 高感受性の結合部位が発現しており、 ^{99m}Tc -GSA はそれに結合していることが確認された。以上のことから、MAC への ^{99m}Tc -GSA の集積機序はエネルギーに依存せず、 ^{99m}Tc -GSA の集積の大部分が h-ASGP-R に相同する asialofetuin 高感受性結合部位に結合していることを見出した。

I. はじめに

現在、非結核性抗酸菌を原因菌として発症する呼吸器感染症である肺非結核性抗酸菌症患者は急激な増加傾向にあり、①胸部画像所見で非結核性抗酸菌症に合致する所見が認められる、②培養検査で非結核性抗酸菌陽性である、③他の疾患が除外される、という 3 項目を満たすことで診断が確定される¹⁾。しかし、そのうち胸部画像所見に関しては、非結核性抗酸菌症の肺 X 線画像所見には特異的なものがなく感染初期での診断が困難である点、細菌培養に関しては、非結核性抗酸菌は培養に長期間を要し確定診断までに 1 ヶ月以上かかることもある点が課題として挙げられている。このため、従来の確定診断法に比べ、非結核性抗酸菌に対し特異的で感度が高く、かつ迅速な診断法が必要とされており²⁾、本研究室では既に臨床で利用されている放射性医薬品を用いた非結核性抗酸菌感染症の核医学画像診断法に着目した。あらかじめ検討した *in vitro* と *in vivo* の集積検討において非結核性抗酸菌症の約 90 %を占める *Mycobacterium avium complex* (MAC) に、現在臨床利用されている放射性医薬品のうち、肝機能診断薬として用いられる肝受容体アジアロシンチグラフィ製剤 ^{99m}Tc -DTPA-galactosyl-human serum albumin (^{99m}Tc -GSA) が高い集積を示すことを確認した。そこで、非結核性抗酸菌症の核医学画像診断を目的として、MAC への ^{99m}Tc -GSA 集積機序を評価した。

II. ^{99m}Tc -GSA 集積における経時的取り込み評価

A) *Mycobacterium* 属の細胞壁構造

Figure 1 に一般的なグラム陽性細菌および *Mycobacterium* 属の細胞壁の構造を示した。非結核性抗酸菌を含む *Mycobacterium* 属はグラム陽性細菌に分類される。一般的なグラム陽性細菌の細胞壁 (Fig.1 (A)) がペプチドグリカン層で構成されるのに対し³⁾、*Mycobacterium* 属の細胞壁 (Fig.1 (B)) は細胞室膜の外側にペプチドグリカンに加えてアラビノガラクトサン、ミコール酸の 3 層からなる脂質成分が約 60 %を占める厚い層状構造を有している。特に、ミコール酸は炭素数が 80 にも及ぶ長炭素鎖脂肪酸であり、多量の脂質を含有することで高度の疎水性を保持しており⁴⁾、さらに、ミコール酸がアラビノガラクトサンに結合して層をなすことでより疎水性が高まるために化合物の細胞壁透過性を低下させ、他の菌種と比較して培養に長時間を要する⁵⁾。

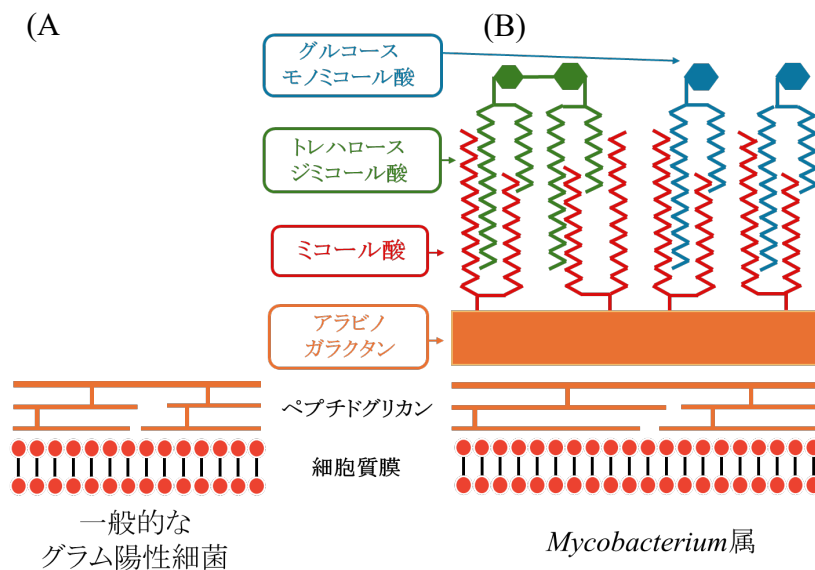


Fig. 1 *Mycobacterium* 属の細胞壁の構造

B) 実験方法

検討する細菌には、非結核性抗酸菌症の約 90 %を占める MAC (*Mycobacterium avium* ATCC700898) を使用した。培地には、Middlebrook 7H9 broth base (Becton, Dickson and company) を用いて作成した 7H9 培地 20 mL を用い、凍結菌液を 60 μL 添加して 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5 % CO_2 好気性条件下で 4 日間振盪培養した。その後、菌液を 3000 $\times g$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間遠心分離して上清を除き、phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.4, タカラ) で置換し、波長 600 nm における吸光度 (OD_{600}) が 0.1 となるように調整した。調整した菌液 990 μL に対して ^{99m}Tc -GSA (日本メジフィジックス) を 74 kBq/10 μL 投与した後、37 $^{\circ}\text{C}$ でそれぞれ 5, 15, 30 分, 1, 2, 4, 6 時間取り込ませた。その後、7000 $\times g$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間遠心分離を行い、上清を除去してペレットをほぐしたところに PBS を加えて再び遠心分離し、洗浄した。2 回洗浄した後、上清を除去し、ほぐしたペレットに 0.1 N NaOH 水溶液を 1.0 mL 加えて菌体を溶解した。その後、MAC に集積した放射能をオートウェル γ カウンター (AccuFLEX ARC- γ 7010, Hitachi Aloka) で測定して集積率を算出した。

C) 結果と考察

Figure 2 に本研究室の先行研究において非結核性抗酸菌と同様のグラム陽性細菌である黄色ブドウ球菌 3 株 (ATCC13179 株、ATCC29213 株、SR3637 株) の 2 時間までの経時的な ^{99m}Tc -GSA 集積率の変化、Fig. 3 に MAC の 6 時間までの経時的な ^{99m}Tc -GSA 集積率の変化を示した。Figure 2 では取り込み 5 分以降で集積率が低下し、Fig. 3 では取り込み 2 時間まで集積率が増加し、2 時間以降集積率が一定となったことから、MAC は一般的なグラム陽性細菌と比較して取り込みに時間を要することが確認された。そこで、以降の MAC への ^{99m}Tc -GSA 集積機序検討では取り込みのタイムポイントを 2 時間に設定した。

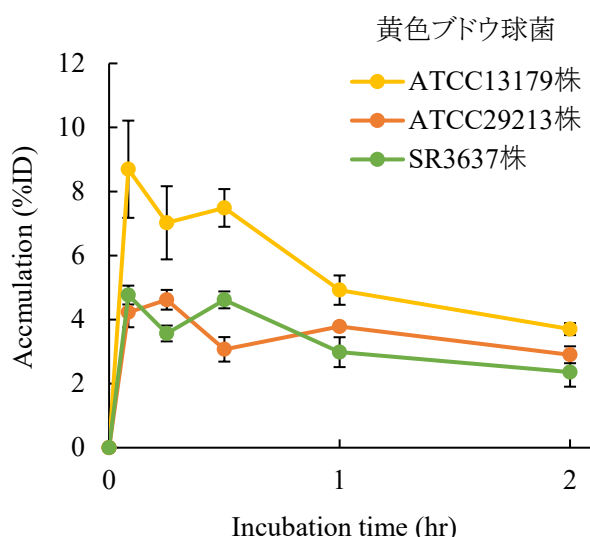


Fig. 2 ^{99m}Tc -GSA を黄色ブドウ球菌に経時的に取り込ませたときの集積率の変化

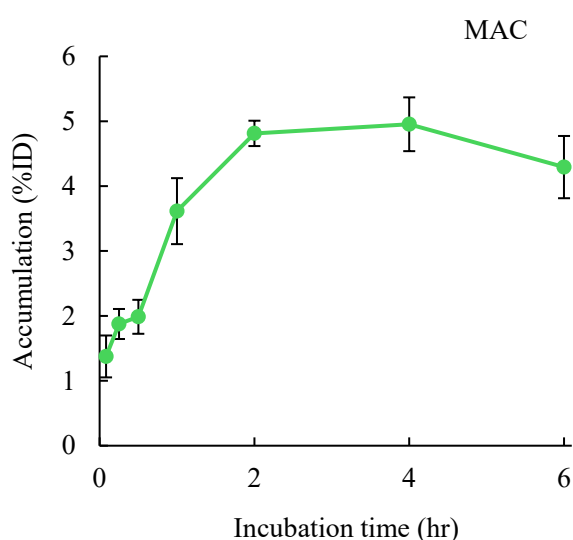


Fig. 3 ^{99m}Tc -GSA を MAC に経時的に取り込ませたときの集積率の変化

III. ^{99m}Tc -GSA 集積における温度依存性評価

A) 実験方法

調整した菌液 990 μL に対して ^{99m}Tc -GSA を 74 kBq/10 μL 投与した後、細菌の増殖に適した環境である 37°C を control とし、低温条件では代謝活性を低下させる 4 °C で氷冷処理、高温条件では 80 °C で 30 分間加熱することで殺菌処理した後に ^{99m}Tc -GSA を 74 kBq/10 μL 投与し、control と高温条件では 37 °C、低温条件では 4 °C で 2 時間取り込ませた。その後、7000 \times g、4 °C で 10 分間遠心分離を行い、上清を除去してほぐしたペレットに PBS を加えて再び遠心分離して洗浄した。2 回洗浄した後、上清を除去し、ペレットをほぐして 0.1 N NaOH 水溶液を 1.0 mL 加えて菌体を溶解し、control に対する氷冷処理および殺菌処理での集積率の割合を算出した。

B) 結果と考察

Figure 4 に MAC への ^{99m}Tc -GSA 集積における温度依存性を示した。 ^{99m}Tc -GSA の集積率は、低温条件では control と同程度だったのに対し、高温条件では 80 % 以上低下した。加熱殺菌することで ^{99m}Tc -GSA の集積率が顕著に低下したことから、 ^{99m}Tc -GSA の集積は MAC の生命活動を反映していると考えられた。一方、代謝活性が低下しても control の ^{99m}Tc -GSA 集積率と同程度であったことから、MAC への ^{99m}Tc -GSA の集積にはエネルギーに依存しない集積機序が関与していることが示された。

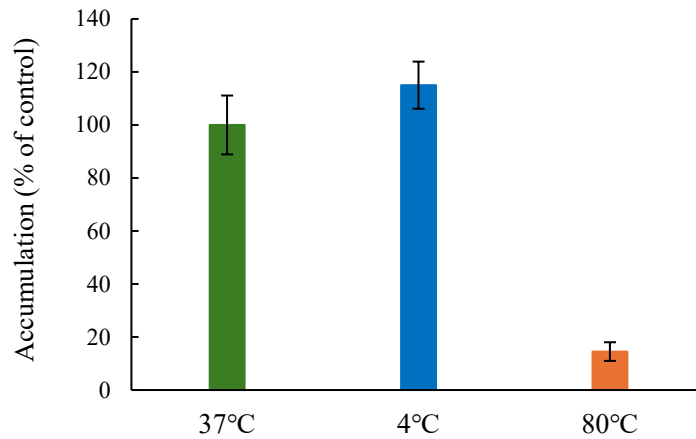


Fig. 4 MAC への ^{99m}Tc -GSA 集積における温度依存性

IV. ^{99m}Tc -GSA 集積におけるヒトアシアロ糖タンパク受容体の競合阻害剤負荷評価

A) 実験方法

MAC への温度依存性評価での結果を踏まえ、エネルギーに依存しない集積機序を明らかにするために、ヒト肝細胞への ^{99m}Tc -GSA の集積機序に着目した。ヒトの肝細胞にはアシアロ糖タンパクと特異的に結合する受容体 human asialoglycoprotein receptor (h-ASGP-R) が存在し、 ^{99m}Tc -GSA が結合すると報告されている⁶⁾。そこで、h-ASGP-R を競合阻害する asialofetuin⁷⁾を MAC に負荷し、MAC への ^{99m}Tc -GSA 集積に及ぼす影響について検討した。

培養した MAC 940 μL に 37 kBq/10 μL の ^{99m}Tc -GSA と最終濃度を 0.01, 0.1, 1.0 mg/mL に調整した h-ASGP-R 競合阻害剤である asialofetuin を 50 μL 、control には asialofetuin 溶液の代わりに PBS を 50 μL 添加し、2 時間取り込ませた。その後、7000 $\times g$, 4 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間遠心分離を行い、上清を除去しペレットをほぐしたところに PBS を加えて再び遠心分離し、洗浄した。2 回洗浄した後、上清を除去し、ほぐしたペレットに 0.1 N NaOH 水溶液を 1.0 mL 加えて菌体を溶解した。その後、III-A と同様に集積率を算出した。

B) 結果と考察

Figure 5 に asialofetuin 負荷における MAC への ^{99m}Tc -GSA 集積を示した。

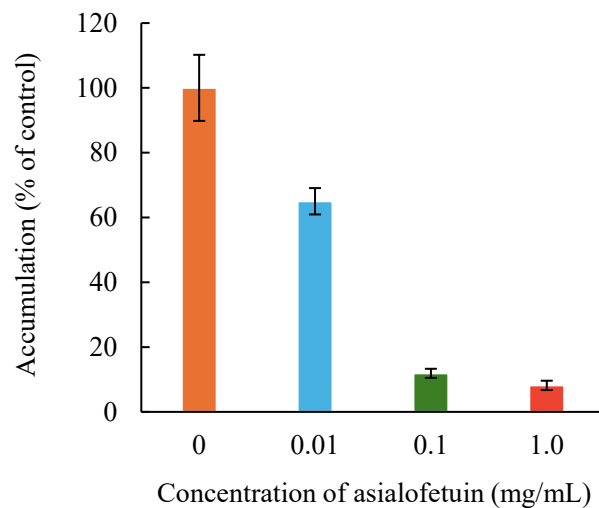


Fig. 5 Asialofetuin 負荷における ^{99m}Tc -GSA の集積

Asialofetuin を負荷すると濃度依存的に ^{99m}Tc -GSA の集積が低下し、かつ、0.1 mg/mL 以上の濃度で ^{99m}Tc -GSA 集積が 80 %以上低下するなど阻害率が高かったことから、MAC が asialofetuin に高感受性であることが確認された。このことから、h-ASGP-R に相同する asialofetuin 高感受性の結合部位が MAC に存在しており、 ^{99m}Tc -GSA の大部分がその結合部位に結合していると考えられた。

V. 結語

^{99m}Tc -GSA の集積は MAC の生命活動を反映しており、エネルギーに依存しない集積機序が関与している可能性が示された。加えて、MAC にはヒト肝細胞に発現しているアシアロ糖タンパク受容体に相同する asialofetuin 高感受性の結合部位が存在し、 ^{99m}Tc -GSA の大部分がその結合部位に結合していることを見出した。

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、水谷明日香助教、ならびに本研究室の方々に、心より御礼申し上げます。

VII. 参考文献

- 1) To K, Cao R, Yegiazaryan A, *et al.* General overview of nontuberculous mycobacteria opportunistic pathogens: *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium abscessus*. *J Clin Med.* 9(8): 2541; 2020.
- 2) Ordonez AA, Sellmyer MA, Gowrishankar G, *et al.* Molecular imaging of bacterial infections: Overcoming the barriers to clinical translation. *Sci Transl Med.* 11(508): eaax8251; 2019.
- 3) 中込 治, 神谷 茂. 標準微生物学(第 12 版). 医学書院. 64-65; 2015.
- 4) Holzheimer M, Buter J, Minnaard AJ. Chemical synthesis of cell wall constituents of *Mycobacterium tuberculosis*. *Chem Rev.* 121(15): 9554-9643; 2021.
- 5) Maitra A, Munshi T, Healy J, *et.al.* Cell wall peptidoglycan in *Mycobacterium tuberculosis*: an achilles' heel for the TB-causing pathogen. *FEMS Microbiol Rev.* 43(5): 548-575; 2019.
- 6) Tamura R, Uemoto S, Tabata Y. Augmented liver targeting of exosomes by surface modification with cationized pullulan. *Acta Biomater.* 57: 274-284; 2017.
- 7) Becker S, Spiess M, Klenk HD. The asialoglycoprotein receptor is a potential liver-specific receptor for Marburg virus. *J Gen Virol.* 76(2): 393-399; 1995.