

がん治療用生菌製剤開発のための
菌種選択および動態評価に関する研究

2020

野村 祥子

目 次

総論の部-----	1
緒言-----	1
第 1 章 腫瘍内増殖を指標とした細菌種選別法の確立と <i>Blautia coccoides</i> の有用性評価---	3
第 1 節 コロニーダイレクト PCR による腫瘍内増殖細菌種同定法の確立-----	3
1-a コロニーダイレクト PCR による <i>Blautia coccoides</i> 、 <i>Bacteroides Vulgatus</i> の同定	
1-b 複数種の細菌混液を投与した際の腫瘍内増殖細菌種の同定	
第 2 節 <i>Blautia coccoides</i> のがん治療用生菌製剤の候補細菌種としての有用性評価-----	7
2-a 担がんマウスの各臓器中に常在細菌に対するダイレクトコロニーPCR	
2-b 静脈内投与した <i>Blautia coccoides</i> の生体内分布と生着に関する評価	
2-c <i>Blautia coccoides</i> の腫瘍への生着に対する投与細菌数の影響に関する評価	
2-d 静脈内投与した <i>Blautia coccoides</i> の宿主免疫賦活作用に関する評価	
第 3 節 考察-----	14
第 2 章 静脈内投与した細菌の全身及び腫瘍内における動態評価-----	17
第 1 節 生物学的吸着に基づく細菌の ⁶⁴ Cu 標識法の確立-----	17
1-a 細菌の ⁶⁴ Cu 標識条件の検討	
1-b 細菌の ⁶⁴ Cu 標識メカニズムに関する評価	
1-c 細菌種による ⁶⁴ Cu 標識効率比較	
第 2 節 大腸菌の静脈内投与後の体内動態評価-----	20
2-a 生体内標識安定性の向上に関する検討	
2-b ⁶⁴ Cu 標識大腸菌の PET イメージング	
2-c 投与細菌数依存的な大腸菌の体内分布	
第 3 節 大腸菌の腫瘍内での動態及び変性に関する評価-----	24
3-a 顕微内視鏡を用いた腫瘍内生着大腸菌のタイムラプスイメージング	
3-b 腫瘍内生着大腸菌の保有プラスミド維持に関する評価	
第 4 節 考察-----	28
結論-----	32

謝辞-----34

実験の部-----35

第1章 実験の部

第2章 実験の部

引用文献-----41

総論の部

緒言

近年、プロバイオティクスをはじめ、生きた細菌を治療に応用する研究が活発に進められている。特に固形腫瘍は、未熟な構造を有する血管の無秩序な走行に伴う低酸素環境や、宿主免疫の抑制、ネクロシスの進行による豊富な栄養源、などの条件を呈し、嫌気性細菌の生着・増殖に有利であることから^{1,2}、主要な治療ターゲットとされている。毒素をもつ細菌の宿主免疫賦活作用を利用して腫瘍を抑える治療戦略は、既にヒト臨床試験にも進んでいる^{3,4}。また最近では、遺伝子改変により細菌に積極的な機能付与を行うことで治療効果を増強するという試みも検討されている。これは、細菌の持つ高い増殖能やタンパク質産生能を活用し、薬効タンパク質産生機構を搭載した細菌が腫瘍内で自己複製しながら抗がん物質を産生する、“On-site Drug Production”の実現を目指すものである（Fig. 1）。その治療戦略も多岐に亘り、細胞傷害性タンパク質の産生によりがん細胞を攻撃するシンプルな系から⁵、より高度ながん免疫療法⁶や自殺遺伝子療法^{7,8}などに基づく戦略の開発、遺伝子回路を駆使して合成生物学的に細菌をデザインする試み^{9,10}などが進められている。

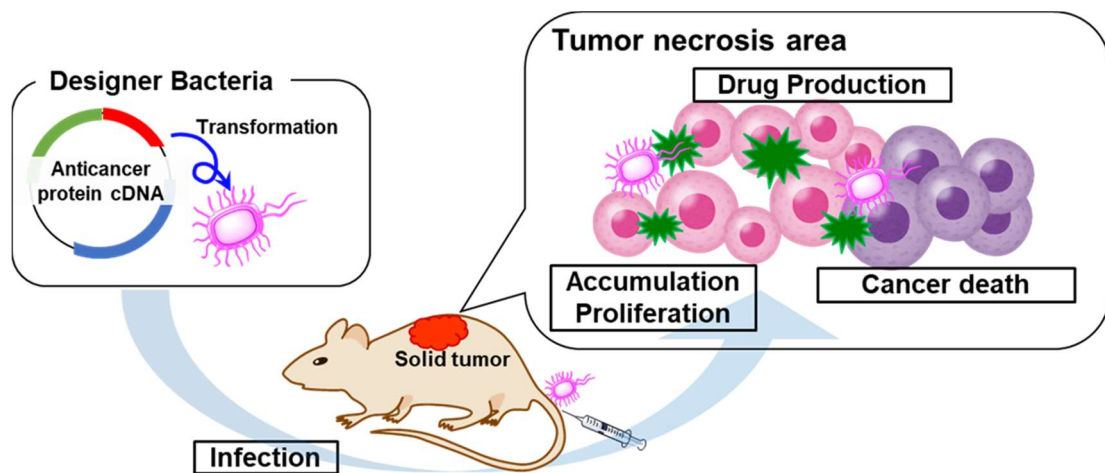


Fig. 1. Idea of Tumor On-site Drug Production using bacteria.

このように、“生きた”製剤（生菌製剤）のより精緻な機能化が進むものの、安全面を考慮した設計や評価に対する技術開発は未だ十分とは言い難い。特に、生体内で生着・増殖するという生菌製剤の特徴から、生菌自体の生体適合性や投与後の体内動態は副作用の惹起に直結する治療応用上欠くことのできない重要な研究課題として挙げられる。

こうした観点から、申請者は、低い免疫原性を実現するがん治療用生菌製剤の有用細菌種候補拡大を目的として、腫瘍内増殖を示す細菌種選別法を確立した。さらに、高い腫瘍内増殖能と安全性を両立する一つの候補細菌種として、哺乳類腸内細菌叢最優勢菌の

Blautia coccoides を見出した。また、生物学的吸着を応用した細菌の ^{64}Cu 標識法を確立し、得られた ^{64}Cu 標識大腸菌の初期体内動態を Positron Emission Tomography (PET) を用いて評価する技術を確立した。加えて、光ファイバー束型蛍光顕微内視鏡を用いた腫瘍深部の観察を行い、腫瘍内に生着した大腸菌の腫瘍内動態の評価を行った。

以下、これらの結果について2章にわたり論述する。

第1章 腫瘍内増殖を指標とした細菌種選別法の確立と

Blautia coccooides の有用性評価

従来、がん治療を目的とした生菌製剤には、サルモネラ菌^{6,11-13}・クロストリジウム菌^{14,15}・大腸菌^{16,17}といった細菌種が主に使用されてきた。これらの細菌種は、毒素によって腫瘍内の宿主免疫を賦活化し、抗腫瘍効果を発揮する、という特徴をもつ。しかし、“On-site Drug Production”を治療概念とし、外来性の抗がんタンパク質を産生する生菌製剤を開発する上では、むしろ免疫原性の低い細菌種が望ましい。例えば、生体内常在細菌は、既に宿主と共存関係にあり、安全性が高い細菌種として有望である。ところが、常在細菌をはじめその他の細菌が腫瘍内増殖能を示すかどうかはほとんど検討されておらず、いずれの細菌種ががん治療用生菌製剤の有用細菌種候補として適当かは明らかでない。

細菌の腫瘍内増殖や生体内分布の評価には、抗生物質によるセレクションなど目的の細菌種に選択的な定量法が必要とされる。しかし、生体内常在菌に抗生物質耐性遺伝子を導入したものはほとんど開発されておらず、従来のセレクション法を適用することができない。この環境整備にはコストと時間がかかるため新しい細菌種を見出す上で大きな障壁となる。そこで本章では、遺伝子改変を伴わない新たなセレクション方法として、細菌の Small subunits ribosomal DNA (16srDNA) 遺伝子配列を解析する手法を構築した。本手法により、ヒト腸内最優勢菌である *Blautia coccooides* 及び *Bacteroides vulgatus* がセレクションできることを確認した上で、両細菌種が *in vivo* において腫瘍内増殖能を有することを見出した。さらに、*Blautia coccooides* について、その生体内分布や免疫原性を詳細に検討した。

第1節 コロニーダイレクト PCR による腫瘍内増殖細菌種同定法の確立

細菌種に特異的な 16srDNA 遺伝子配列を PCR 増幅し、それらの配列を解読、あるいは電気泳動パターンを取得することにより、細菌種を正確に同定することが可能である。本手法は、これまでに、微生物学分野における系統分類¹⁸や、糞便・歯垢中の細菌種の同定などに使用されてきた¹⁹⁻²¹。この方法は、腫瘍や組織内で生着・増殖した細菌種を単離・同定することにも応用でき、抗生物質などに代わる新しいセレクションの手段になると考えられる。

腫瘍や組織内に生着した細菌は、組織のホモジネート希釈液を寒天培地に播種することで、コロニーとして容易に単離できる。これは Colony forming units (CFUs) に基づいて定量的に評価できる一方で、コロニーダイレクト PCR によって細菌種の同定にも応用することができる。コロニーダイレクト PCR 法では、細菌のコロニーを直接反応液に懸濁し、試料からの核酸抽出・精製を行わずに、溶菌から PCR 増幅までをワンステップで実施でき

る。従来、遺伝子工学における形質転換確認において汎用されてきた方法であるが、腫瘍や組織からコロニー単離された細菌種の 16srDNA 配列の PCR 増幅にも有効と考えられる。

そこで本節では、常在細菌を対象として、細菌特異的な 16srDNA 配列をコロニーダイレクト PCR によって増幅し、それぞれの細菌種を同定する手法を確立した。さらにその手法を用いて、腫瘍内に複数種の細菌を混液投与した後で腫瘍で増殖した細菌種を同定できるかを検討した。

1-a コロニーダイレクト PCR による *Blautia coccooides*、*Bacteroides vulgatus* の同定

コロニーダイレクト PCR では、溶菌を PCR 反応液中で実施する。そのため、グラム陽性菌のように分厚く強固なペプチドグリカン構造を有する細菌種に対して応用するには、溶菌条件の工夫が必要である。また、溶菌により露出したゲノム DNA を直接 DNA テンプレートとするため、テンプレートが長く、また凝集している可能性からその PCR 増幅はプラスミドなどと比較して困難であると懸念される。そこでまず、コロニーダイレクト PCR の反応条件を検討した。評価には、ヒトを含む哺乳類の腸内最優勢菌とされているグラム陽性菌の *Blautia coccooides* (JCM 1395^T) 及び *Bifidobacterium longum* (JCM 1217^T)、グラム陰性菌の *Bacteroides vulgatus* (JCM 5826^T) を用いた。このうち *B. coccooides* 及び *B. vulgatus* の同定を目的として、それぞれの同定に既に実績のあるプライマー配列を使用した (Table 1)。細菌は、いずれも対数増殖期まで嫌気培養した後、GAM 寒天培地上でコロニー形成させたものを使用した。

Table 1. Species-specific 16srDNA targeted bacterial primers used in this study.

Species	Oligonucleotide sequence (5'→3')	Amplicon size	Reference
<i>Blautia coccooides</i>	F: 5'-AAATGACGGTACCTGACTAA-3'	438 bp	Kurakawa <i>et al.</i> (2015)
	R: 5'-CTTTGAGTTTCATTCTTGCGAA-3'		
<i>Bacteroides vulgatus</i>	F: 5'-GCATCATGAGTCCGCCATGTTC-3'	287 bp	Wang <i>et al.</i> (1996)
	R: 5'-TCCATACCCGACTTTATTCCTT-3'		

コロニーダイレクト PCR では、通常、大腸菌などのグラム陰性菌を熱処理によって溶菌する。そこでまず、95°C、5 min の熱処理を検討した。しかし本条件ではグラム陽性菌の溶菌が不十分であり、PCR 増幅も観察されなかった。そこで、95°C、5 min の熱処理に加えて、さらなる溶菌ステップとして組織破碎用ガラスビーズを用いたボルテックスを行ったが、得られた上清を PCR にかけても安定した増幅が得られなかった。この原因として、テンプレートのゲノム DNA が凝集しているのではないかと考え、制限酵素 *Sma* I を用いてランダムな切断処理を施すこととした (Fig. 2)。

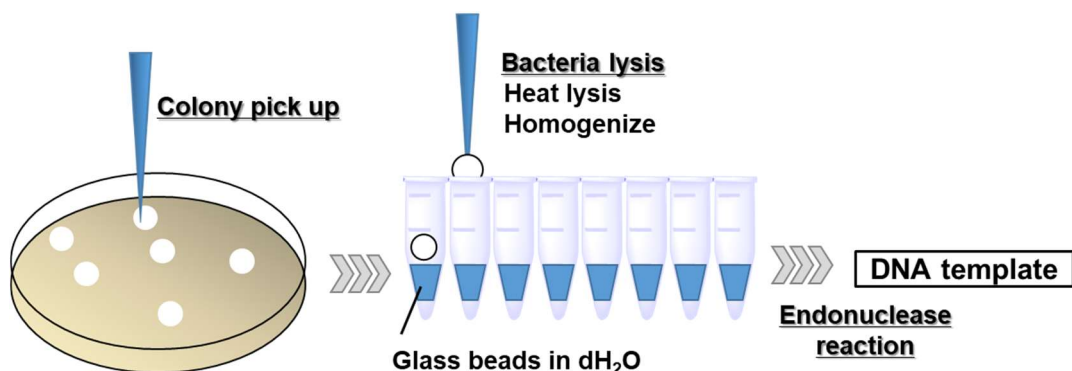


Fig. 2. DNA template preparation protocol for direct colony PCR.

本改善策の有効性を検証するために、3種類の細菌 (*B. coccoides*、*B. longum*、*B. vulgatus*) を別々の寒天培地に播種し、それぞれのコロニーに対してコロニーダイレクト PCR を実施した。その結果、*B. coccoides*、*B. vulgatus* いずれにおいても、それぞれに特異的な配列の PCR 増幅が確認された (Fig. 3)。これらの結果より、*B. coccoides* 及び *B. vulgatus* の溶菌は熱処理条件の工夫により、DNA テンプレート調製には制限酵素を用いたゲノム DNA の切断により、グラム陽性菌の PCR 増幅が可能であることが示された。一方、いずれのコロニーダイレクト PCR においても、目的としない細菌種に由来する複数の DNA フラグメントが確認された。ただし、これらの電気泳動パターンは *B. coccoides* あるいは *B. vulgatus* 特異的配列の増幅産物とは大きく異なるため、同定対象の細菌種との判別が可能であった。以上より、決定した反応条件において、*B. coccoides* 及び *B. vulgatus* のコロニーダイレクト PCR による同定が可能であることが示された。

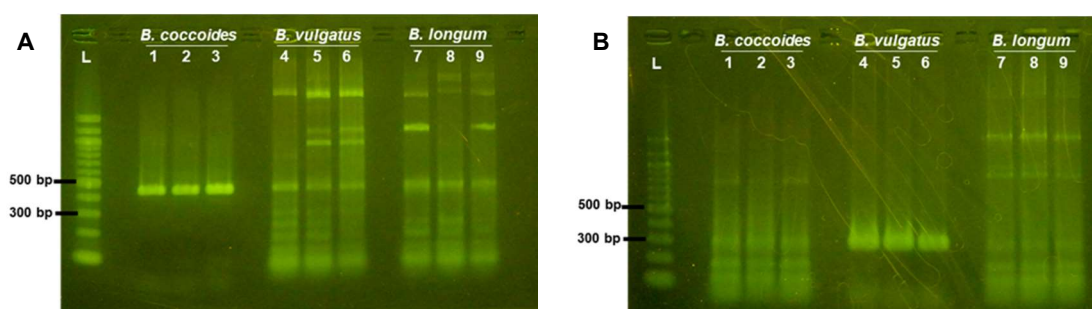


Fig. 3. PCR amplification of 16srDNA by primers for (A) *B. coccoides* and (B) *B. vulgatus*.

Lane 1-3 are PCR amplicons from *B. coccoides*, 4-6 are from *B. vulgatus*, and 7-9 are from *B. longum*.

次に、複数種の細菌が混在する寒天培地から、コロニーダイレクト PCR に基づいてそれぞれの細菌種を同定できるか検討した。*B. coccooides* (7.4×10^7 CFU/ml) と *B. vulgatus* (2.7×10^8 CFU/ml) の混合液の希釈液を GAM 寒天培地に播種した。形成されたコロニーから5つを選択し、それぞれに対してコロニーダイレクト PCR を行った (Fig. 4)。その結果、コロニーNo.1、3、4からは *B. vulgatus* 特異的配列の増幅のみが確認され、*B. coccooides* 特異的配列の増幅は見られなかった。一方、No.2、5のコロニーは *B. coccooides* 特異的配列の増幅のみを示した。これらの結果から、複数種の細菌が混在している場合にも、16srDNA 配列を増幅するコロニーダイレクト PCR によって特定の細菌種を判別できることが示された。

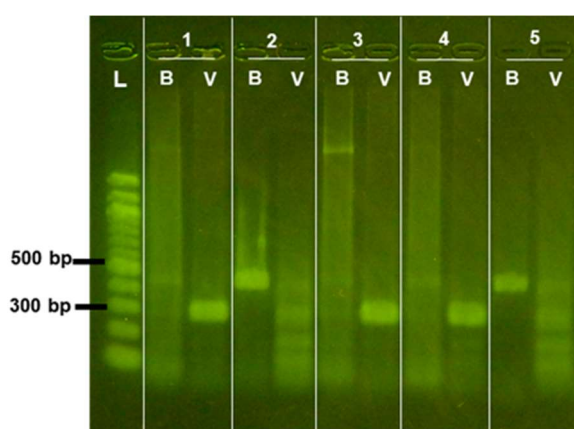


Fig. 4. PCR amplification of 16srDNA from 5 colonies picked from agar plate of *B. coccooides* and *B. vulgatus* mixture. PCR amplicons by primers for *B. coccooides* and *B. vulgatus* were loaded in lane B and lane V respectively. The number in the figure indicates each colony.

1-b 複数種の細菌混液を投与した際の腫瘍内増殖細菌種の同定

最後に、1-a で確立したコロニーダイレクト PCR の手法を用いて、腫瘍内で増殖した細菌種が同定できるかを検討した。*B. coccooides* (3.7×10^7 CFU/mouse) と *B. vulgatus* (5.4×10^7 CFU/mouse) の混合液を、colon-26 担がんマウスに静脈内投与し、一週間後に腫瘍における生着を評価した。腫瘍ホモジネートを 10^5 倍希釈してプレート上に播種し、形成されたコロニーから5つを選択して1-aと同じ方法でダイレクト PCR を行ったところ、コロニーNo.1、2、5は *B. vulgatus* 特異的配列の増幅のみを示し、*B. coccooides* 特異的配列の増幅は示さなかった。(Fig. 5B)。一方No.3、4からは *B. coccooides* 特異的配列の PCR 増幅のみが観察された (Fig. 5A)。以上の結果より、*B. coccooides* と *B. vulgatus* の両細菌が腫瘍内で 10^5 CFU/tumor 以上に増殖すること、本コロニーダイレクト PCR 法によって腫瘍内で増殖した複数の細菌を区別して同定できることが明らかとなった。従って本手法は、細菌の遺伝子改変を必要とせず、腫瘍内で増殖能を示す細菌種をスクリーニングする手法として応用可能であることが示された。

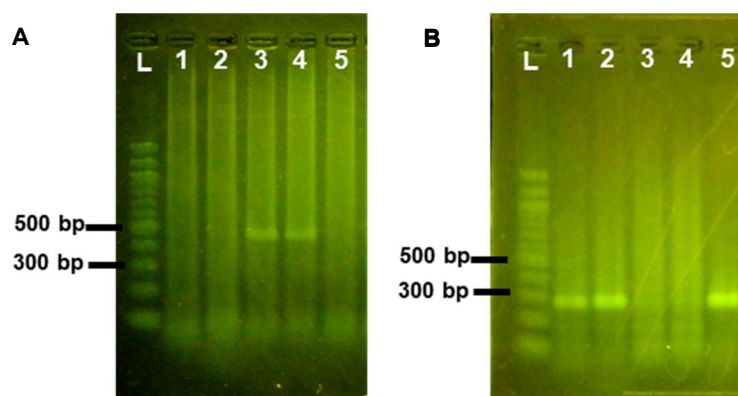


Fig. 5. PCR amplification of 16srDNA from 5 colonies picked from tumor homogenate dilution ($\times 10^5$) plated agar. PCR amplicons by primers for (A) *B. coccoides* and (B) *B. vulgatus*. Tumor tissue was isolated from colon-26 tumor-bearing mouse a week later after receiving bacterial mixture of *B. coccoides* (3.7×10^7 CFU/mouse) and *B. vulgatus* (5.4×10^7 CFU/mouse). The number in the figure indicates each colony.

第2節 *Blautia coccoides* のがん治療用生菌製剤の候補細菌種としての有用性評価

本節では、腫瘍内で増殖能を示した *Blautia coccoides* を用い、投与後の各組織への分布及び生着の評価を行った。また、本菌の全身投与後の免疫応答反応についても検討を行い、がん治療用生菌製剤の候補細菌種としての有用性を評価した。

2-a 担がんマウスの各臓器中に常在細菌に対するコロニーダイレクト PCR

B. coccoides の生体内分布実験に先立ち、colon-26 担がんマウスの各臓器における常在菌の分布を評価した。colon-26 を皮下移植し通常飼育したマウスから腫瘍、肝臓、肺、脾臓及び腎臓を摘出し、各組織のホモジネートを GAM 寒天培地に播種して嫌気培養した後、常在菌のコロニー数を評価した。その結果、臓器によりコロニー数が 10^{2-5} CFU/tissue と異なるものの、いずれの臓器からも一定レベルの嫌気性菌が検出された (Fig. 6)。

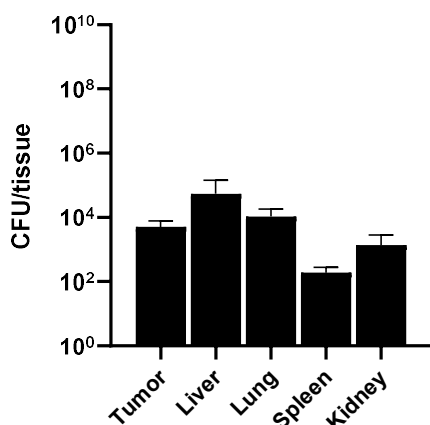


Fig. 6. The number of commensal bacteria in organs and tissues of conventionally housed colon-26 tumor-bearing mice. Each value represents mean \pm SD (n = 3).

そこで、*B. coccoides* を他の常在菌と区別できるかを確認するために、確認された常在菌のコロニーに対して *B. coccoides* 特異的 16srDNA 配列のダイレクト PCR を行った。その結果、いずれの臓器からも、*B. coccoides* 特異的 16srDNA 配列増幅時の DNA フラグメント泳動パターンに類似する非特異的増幅は確認されなかった (Fig. 7)。従って、臓器内の常在菌に *B. coccoides* は含まれず、投与した *B. coccoides* のみを選択的に評価することが可能であると考えられる。

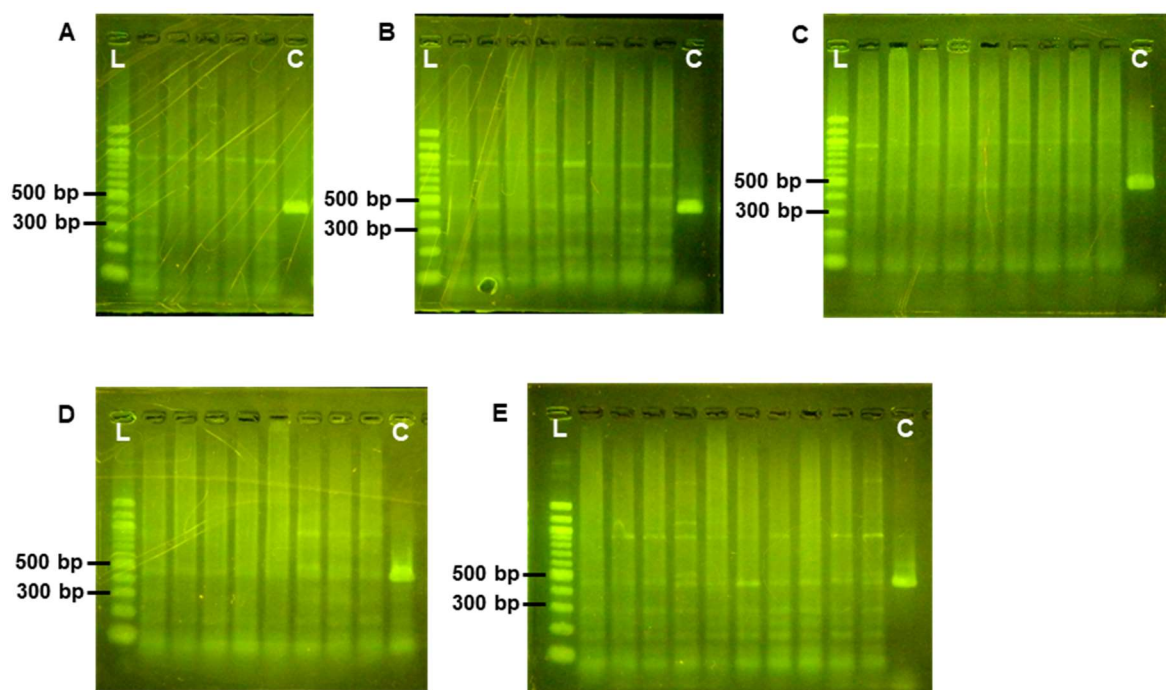


Fig. 7. PCR amplification of 16srDNA by primers for *B. coccoides*.

Colonies were picked from agars plated homogenate dilution of (A) tumor ($\times 10$), (B) kidney ($\times 10$), (C) Lung ($\times 100$), (D) Liver ($\times 100$), (E) Spleen ($\times 10$). PCR amplicons of *B. coccoides* were loaded in lane C as a control.

2-b 静脈内投与した *Blautia coccoides* の生体内分布と生着に関する評価

全身投与した *B. coccoides* の生体内分布及び生着の評価を試みた。Colon-26 担がんマウスの尾静脈より 6.8×10^7 CFU/mouse の *B. coccoides* を投与し、投与から 2 時間、3、7、14 日後のタイムポイントにおいて腫瘍、肝臓、肺、脾臓及び腎臓を回収した。各臓器をホモジネートして寒天培地に播種し、まずはコロニーカウント法に基づいて常在菌を含む全細菌の数を評価した (Fig. 8)。肺や肝臓では初期から比較的高いレベルで菌が分布し、14 日間に亘って一定レベルに維持された。脾臓や腎臓では細菌数が徐々に減少する様子が確認された。これに対して、腫瘍では、投与後 2 時間では細菌数が少なかったものの、経日的に

増大し、14日間で 10^6 倍にまで増殖した。この結果より、投与した *B. coccoides* は腫瘍選択的に増殖するのではないかと推察された。

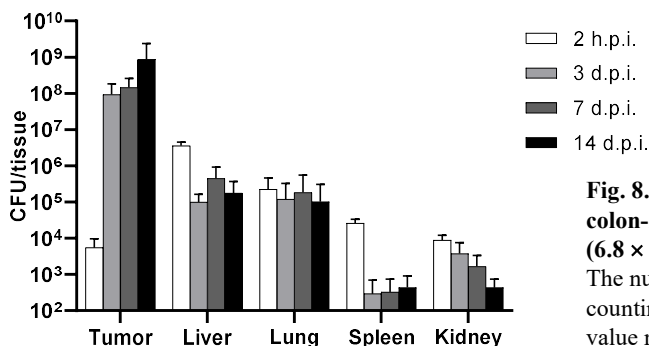


Fig. 8. Bacterial colonization in tumor and organs of colon-26 tumor-bearing mice receiving *B. coccoides* (6.8×10^7 CFU).

The number of bacteria were determined by CFU counting at 2 h, 3 d, 7 d, and 14 d from injection. Each value represents the mean \pm SD ($n = 3-4$).

そこで、*B. coccoides* 選択的な評価として、寒天培地からコロニーを回収し、*B. coccoides* 特異的 16srDNA 配列を増幅するコロニーダイレクト PCR を行った。その結果、*B. coccoides* 投与直後に腫瘍に分布している細菌には PCR 増幅されない常在菌が混在していたが、投与後 1 日以降に検出される菌種は全て *B. coccoides* であると同定された。一方、各臓器から検出されたコロニーからは、*B. coccoides* 配列の増幅は殆ど確認されなかった (Fig. 9)。これらの結果より、投与した *B. coccoides* は腫瘍でのみ選択的に増殖し、その他の臓器には常在菌が分布するのみで *B. coccoides* は生着しないことが示された。

さらに、腫瘍内で増殖した *B. coccoides* の局在を組織学的に観察した。Colon-26 担がんマウスに 2.7×10^8 CFU/mouse の *B. coccoides* を静脈内投与してから 1 週間後に腫瘍を摘出し、グラム染色及びヘマトキシリン&エオシン (H&E) 染色を行った。その結果、*B. coccoides* は腫瘍内中心部のネクロシス部位周辺に偏在して存在することが明らかとなった (Fig. 10)。

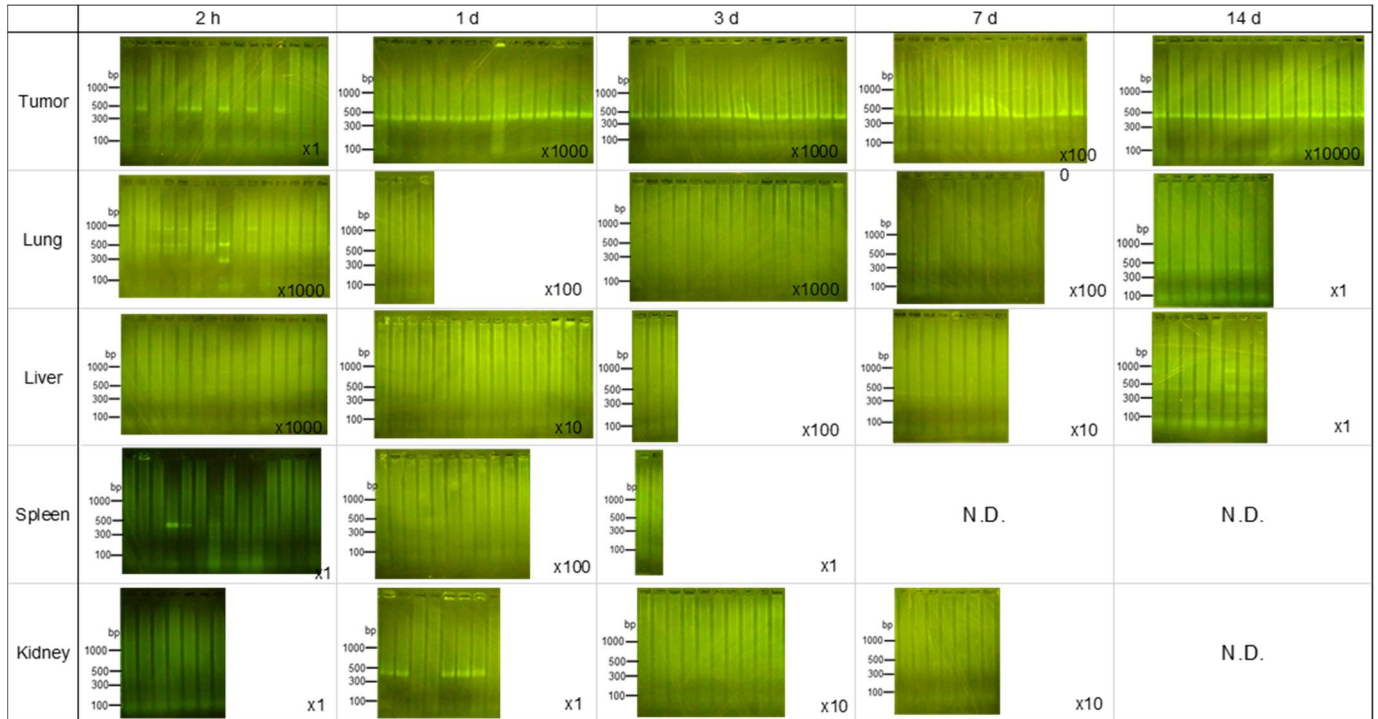


Fig. 9. Typical gel image of electrophoresis results of PCR amplicons of 16srDNA from colonies picked from tumor and tissue homogenate dilution plated agar.

Tumors and organs were extracted from colon-26 tumor-bearing mice received *B. coccooides* (1.5×10^7 CFU). The numbers at the bottom left indicate the dilution factor of the homogenate of each organ.

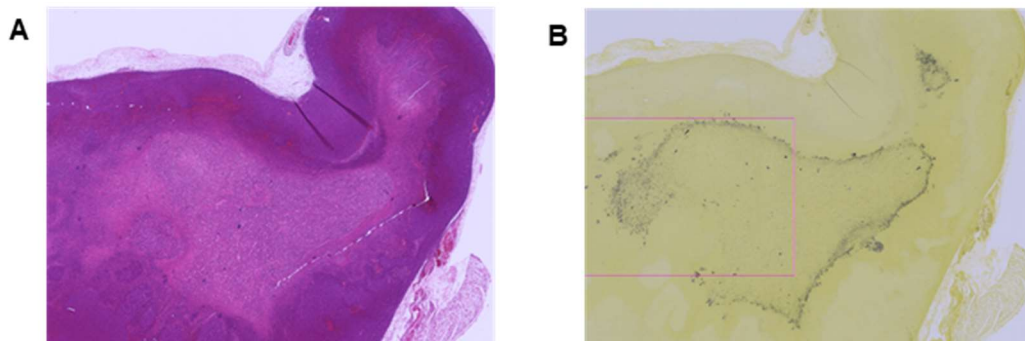


Fig. 10. Tumor histological analysis of mice intravenously injected with *B. coccooides*.

Tumor sections with H&E staining (A) and Gram staining (B) at 7 days after *B. coccooides* injection (2.7×10^8 CFU/mouse). Original magnifications were at $\times 1$.

2-c *Blautia coccoides* の腫瘍への生着に対する投与細菌数の影響に関する評価

2-a、2-bにおいて、腫瘍内常在菌は 10^{3-4} CFU/tumor 以下と低く、投与翌日以降、 10^3 倍以上に希釈した腫瘍ホモジネートから単離される細菌は全て *B. coccoides* であることが確認された。従って、腫瘍内で 10^4 CFU/tumor 以上に観察される細菌は *B. coccoides* と考えられる。そこで以降はコロニーカウント法を用いることとし、*B. coccoides* の腫瘍への生着に対する投与菌数の影響を検討した *B. coccoides* を Low dose (3.2×10^5 CFU/mouse)、Middle dose (1.6×10^7 CFU/mouse)、High dose (1.6×10^8 CFU/mouse) で colon-26 担がんマウス尾静脈より全身投与した結果、投与細菌数が多いほど *B. coccoides* の腫瘍への生着数が多く、個体間変動も小さいことから、安定して菌が増殖することが示唆された (Fig. 11)。ただし、腫瘍内細菌数は、いずれの投与細菌数でも 10^{8-9} CFU/tumor で頭打ちとなり、増殖しうる細菌数には上限があることも示唆された。

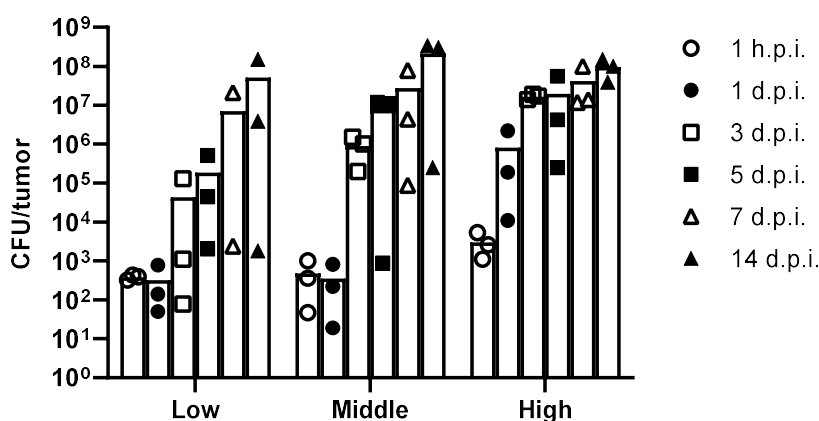


Fig. 11. Dose dependency of bacterial colonization in tumor.

The number of bacteria was determined by CFU counting at 1 h, 1 d, 3 d, 5 d, 7 d, and 14 d from intravenous injection of the low-dose (3.2×10^5 CFU), medium-dose (1.6×10^7 CFU), and high-dose (1.6×10^8 CFU) *B. coccoides*. Each point represents the value for mouse and the bars represent the mean for each group ($n = 3$).

2-d 静脈内投与した *Blautia coccoides* の宿主免疫賦活作用に関する評価

B. coccoides の全身投与時の安全性指標の一つとして、炎症性サイトカイン (TNF α 、IL-6、IFN- γ) の産生量に基づく宿主免疫賦活作用を評価した。対照群として、免疫原性の低いビフィズス菌 (*B. longum*) 投与群及び、ヒト臨床試験が実施されているサルモネラ菌同様に lipopolysaccharide を発現することから炎症惹起が懸念される大腸菌投与群を設定した。各菌を $3.0-6.7 \times 10^7$ CFU/mouse の投与量で静脈内投与してから 1.5 h、6.0 h 後に血液を

回収し、1.5 h 後の TNF α 、IL-6、6 h 後の IFN- γ の血中濃度を ELISA にて測定した。その結果、*B. coccoides* 投与群の血中炎症性サイトカイン濃度は大腸菌投与群と比較して有意に低く、*B. longum* 投与群と同程度であった (Fig. 12A-C)。

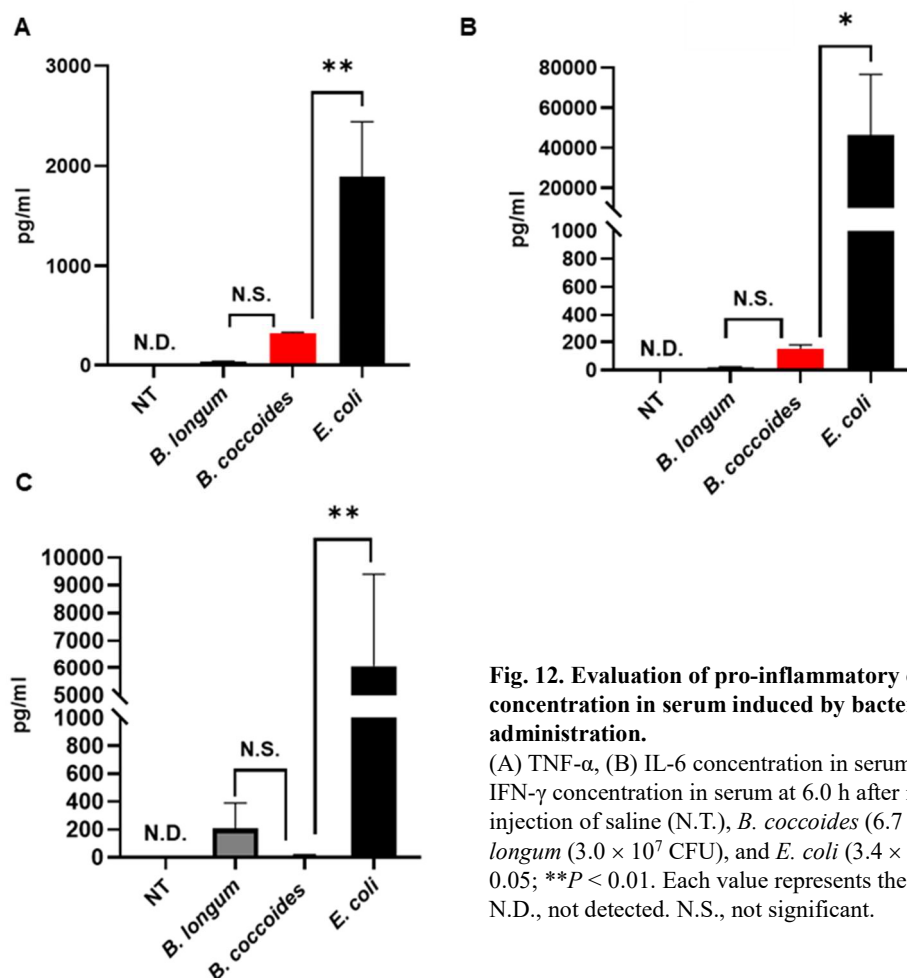


Fig. 12. Evaluation of pro-inflammatory cytokine concentration in serum induced by bacterial administration.

(A) TNF- α , (B) IL-6 concentration in serum at 1.5 h and (C) IFN- γ concentration in serum at 6.0 h after intravenous injection of saline (N.T.), *B. coccoides* (6.7×10^7 CFU), *B. longum* (3.0×10^7 CFU), and *E. coli* (3.4×10^7 CFU). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. Each value represents the mean \pm SD ($n = 3$). N.D., not detected. N.S., not significant.

また、Low dose (5.4×10^7 CFU/mouse)、Middle dose (2.7×10^7 CFU/mouse)、High dose (2.7×10^8 CFU/mouse) それぞれの細菌数で *B. coccoides* を静脈内投与し、2 週間に亘って体重と脾臓重量を測定した。いずれの投与細菌数においても体重減少は観察されなかった (Fig. 13A)。また、High dose、Middle dose 投与群において一時的な脾臓肥大が確認されたが、投与から 2 週間経過後の脾臓重量は N.T. (Saline 投与群) と有意な差を示さなかった (Fig. 13B)。これらの結果より、*B. coccoides* の免疫賦活作用は非常に低いことが示唆された。

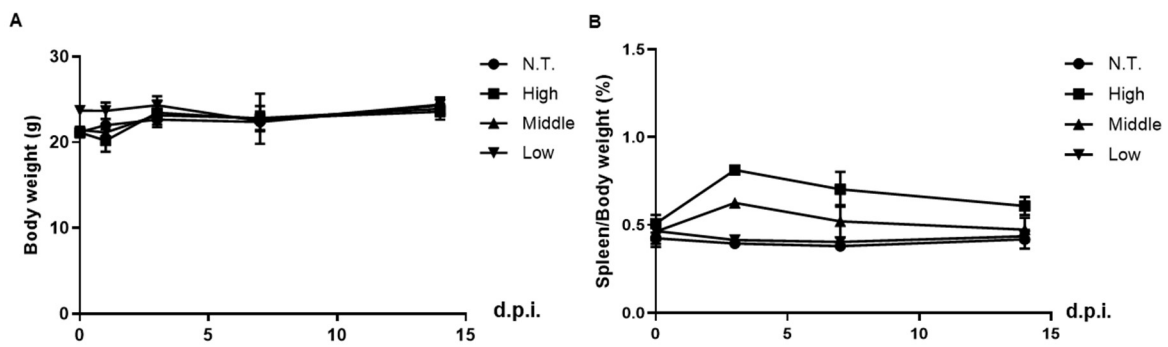


Fig. 13. Long-term immune response of mice following *B. coccooides* administration.

(A) Body weight and (B) spleen weight change after intravenous injection of the low-dose (5.4×10^5 CFU), medium-dose (2.7×10^7 CFU), and high-dose (2.7×10^8 CFU) *B. coccooides*. Each value represents the mean \pm SD ($n = 3-4$).

第3節 考察

本章では、遺伝子改変技術が確立されていない細菌種を特異的に検出する新たな方法として、それぞれの Small subunits ribosomal DNA (16srDNA) 遺伝子配列に基づく細菌種同定法を確立した。本手法は腫瘍ホモジネート中の細菌の同定にも有効であり、*B. coccoides* と *B. vulgatus* の両細菌が腫瘍内で増殖能を発揮することを明らかにした。さらに、*B. coccoides* についてさらなる検討を加え、本菌は、腫瘍でのみ選択的に増殖し宿主免疫をほとんど賦活しないことから、がん治療用生菌製剤のための有用な候補細菌種であることを見出した。

腫瘍組織には、癌細胞や宿主免疫細胞、それらの死骸や分泌物などが含まれる。従って、腫瘍ホモジネートを寒天培地上で培養し、内部の細菌にコロニーを形成させることで、腫瘍内増殖細菌の簡便な単離が可能である。またコロニーによる単離は、生細菌のみを定量的に評価できることから、腫瘍内細菌数を評価する上でも汎用されてきた²²⁻²⁵。本章でも、細菌をコロニー単離し、その 16srDNA 配列をコロニーダイレクト PCR によって増幅することで、組織からの細菌の単離から同定までを簡便に行うことができた。

B. coccoides 及び *B. longum* の溶菌は、組織破碎用ガラスビーズとボルテックスにより成功した (Fig. 2)。コロニーダイレクト PCR は、細菌が目的のプラスミドベクターによって形質転換されたかを確認する手法として遺伝子工学の分野で汎用されている²⁶⁻²⁸。そのため、主に大腸菌を対象に実施されることが多い。これらグラム陰性菌はコロニーを直接懸濁した PCR 反応液の熱処理のみで十分に溶菌する。しかし、本章で評価した *B. coccoides* をはじめとするグラム陽性菌は、細菌膜に分厚いペプチドグリカン層を有している。そのため、溶菌には加熱処理に加え更なる物理的な破碎処理が必要であった。

コロニーダイレクト PCR では、未精製のゲノム DNA をテンプレートとする。細菌のゲノムは真核生物のようにクロマチン構造を持たないものの、染色体 DNA が折りたたまれた状態にある。ゲノム DNA の凝集の程度によってはポリメラーゼやプライマーのアクセスが阻害されることが懸念された。クロストリジウム菌をはじめ、細菌のゲノム DNA は、*Sma* I や *Xho* I といった制限酵素で処理することで数十~数百 kbp の DNA 断片にランダムに切断され、電気泳動により分離が可能になることが報告されている^{29,30}。そこで、ゲノム DNA の切断により、凝集に伴う PCR プライマーのアクセスに対する立体障害の問題を解消することを期待し、PCR 前に DNA テンプレートに制限酵素処理を実施した。グラム陽性菌の溶菌条件の改善と併せて、本処理の導入によりコロニーダイレクト PCR に用いる DNA テンプレートの調製に成功した (Fig. 3A)。

本章で用いた *B. coccoides* 及び *B. vulgatus* の 16srDNA に対するプライマーは、両細菌の糞便などからの検出や q-PCR 定量に実績のある配列である^{19,31}。コロニーダイレクト PCR 後の電気泳動により、該当配列の増幅産物のみが確認された (Fig. 3)。目的以外の細菌種においても非特異的な増幅産物も確認されたが、それらの電気泳動パターンは標的のもの

と大きく異なったことから、*B. coccoides* や *B. vulgatus* との区別が可能であった。16srDNAの中で細菌種特異的な配列部分は限られており、近縁の細菌種間では相同的であることが多い³²。従って、厳密な細菌種の同定には、通常、PCR増幅産物の配列解読が行われる¹⁸。一方で、検出したい細菌種が既知である場合には、予めコントロールとして対象細菌のPCR産物の長さやゲルの泳動パターンを評価しておき、それらと比較することで細菌種の同定が可能である^{21,31,33}。口腔内プラーク中に含まれる主要な歯周病細菌²⁰や、マウス腸内に存在するヘリコバクター菌³⁴などはこの方法で同定されている。本章で確立した手法も、腫瘍や臓器からの特定の細菌種の検出を目的としており、評価対象の細菌種は既知である。従って、増幅産物の泳動パターンを用いて細菌種の同定が可能であり、増幅産物の精製・配列解読を必要としない簡便な手法であると考えられる。

腸内や肺をはじめ、生体内臓器にはそれぞれ常在菌が存在する^{35,36}。本章で確立したコロニーダイレクトPCRによる細菌種の同定法によって、腫瘍内で増殖あるいは生体内に分布する*B. coccoides*を組織内常在菌と区別して検出することができた (Fig. 7, 9)。Colon-26担がんマウスの組織内から検出された 10^{2-5} CFU/mouseの常在嫌気性細菌のなかに、*B. coccoides*の16srDNA配列増幅を示すものは検出されなかった。このことから、投与した*B. coccoides*の生着・増殖を選択的に評価できたものと考えられる。これまで、がん治療用生菌製剤の主流細菌である大腸菌、サルモネラ菌、クロストリジウム菌などは、抗生物質などを用いたセレクションを介して選択的に評価されてきた^{6,37,38}。一方で、遺伝子改変技術を持たない細菌を組織内の常在菌と区別する手法は開発されていなかった。そのため、がん治療用生菌製剤の使用細菌種は遺伝子改変技術をもつものに限定され、有用細菌種の拡大は進んでいなかった。本章で確立したコロニーダイレクトPCRによる細菌種の同定法は、従来のセレクション法にかわり、遺伝子改変技術を持たない細菌種を選択的・定量的な検出を可能にした。

静脈内投与直後、腫瘍内には*B. coccoides*以外に常在菌が混在していたが、1日目以降検出されるコロニーは全て*B. coccoides*であった (Fig. 9)。このことから、腫瘍内では*B. coccoides*が選択的に増殖し、本菌の生着が刺激となって常在菌が増殖することはなかったものと考えられる。投与14日後の腫瘍内における菌体数は、 10^{8-9} CFU/tumor前後であった (Fig. 8, 11)。腫瘍での増殖は、従来の抗生物質を介したセレクションに基づいて報告されてきた大腸菌やサルモネラ菌と一致していた^{23,39}。しかし、ヒト臨床試験が実施されている主要ながん治療用細菌のサルモネラ菌が、腫瘍内で 10^{6-7} CFU/tumorまで増殖することと比較して⁴⁰、その最終細菌数は10-100倍と高かった。その他の臓器において、投与直後から*B. coccoides*はほとんど検出されず、経日的な増殖も観察されなかった。過去の報告において、投与6日後の肝臓から約 10^6 CFUのサルモネラ菌が検出されている^{12,41}。これと比較して、組織に到達した*B. coccoides*の割合が常在菌にくらべて低く、迅速にクリアランスされたものと考えられる。これらの結果より、本菌が腫瘍選択的に高い増殖能を示すことが明らかとなった。

がん治療用生菌製剤の主な副作用として、腫瘍に留まらない細菌による宿主免疫賦活作用が挙げられる。サルモネラ菌や大腸菌の内毒素による腫瘍内の免疫賦活は抗腫瘍効果に有用である。しかしその一方で、サルモネラ菌を全身投与したマウスにおいて脾臓が4-5倍に肥大した例や、体重が5-10%減少した例なども報告されている^{23,41}。ヒト臨床試験においても、炎症性サイトカインの血中濃度の上昇や、炎症反応に伴う発熱、筋肉痛などの副作用が報告されている³。これらの報告とは異なり、*B. coccoides* を静脈内投与しても炎症性サイトカイン産生量はかなり低いレベルであった (Fig. 12)。その産生量は、高い安全性を期待して先行的に研究が進められていたビフィズス菌^{8,22,38,42}と同程度であった。さらに、 10^8 CFU/mouse という High-dose を投与した際にも顕著な体重減少は観察されず、脾臓肥大も一時的な現象にとどまった (Fig. 13) ことから、*B. coccoides* の宿主の免疫賦活作用が非常に小さいことが示唆された。がん治療用生菌製剤を臨床に応用する際、生菌製剤の複数回投与の可能性も考えられる。その際、既に投与した細菌種に対して免疫を獲得し、副作用の惹起や効果の低下に繋がる懸念がある。これらの観点からも、有用細菌種の候補を複数拡大することは有意義であり、本菌がビフィズス菌に続いて高い安全性を実現する細菌種であることが期待される。

以上、16srDNA 配列に対するコロニーダイレクト PCR によって組織内に生着した細菌種を同定する手法を確立した。これにより、遺伝子改変技術を持たない細菌種の腫瘍内増殖や生体内分布を選択的に評価できるようになった。さらに本手法は、腫瘍内に複数の細菌種が混在している場合にも有効であったことから、腫瘍内増殖能を有する細菌種の選別にも活用できる。ゲノム DNA の精製や PCR 産物の配列解読を必要としないその簡便さから、多くの細菌種を評価対象としたがん治療用生菌製剤有用細菌種のスクリーニングを可能にすると期待できる。加えて、哺乳動物の腸内細菌叢最優勢菌の *B. coccoides* が、腫瘍内選択的な増殖を示すことを見出した。さらに、本細菌の静脈内投与時の宿主免疫賦活作用は、内毒素を有する細菌種と比較して軽微であった。従って、*B. coccoides* は、高い安全性と腫瘍内増殖を実現する有用ながん治療用生菌製剤の細菌種候補として期待される。

第2章 静脈内投与した細菌の全身及び腫瘍内における動態評価

がん治療用生菌製剤は、転移した固形癌なども治療対象とするべく、静脈を介して全身投与される^{6,9,24}。投与された細菌は、腫瘍選択的に生着・増殖することが望まれるが、血流を介した組織分布は非選択的であり、投与後初期の生体内分布が免疫反応などの副作用を惹起する可能性が考えられる。これにも関わらず、従来の生菌製剤の研究は治療的有効性の評価にのみ主眼が置かれ、体内動態・安全性面での情報が欠けている。生物発光や蛍光イメージングを利用して細菌の組織分布を検討した報告もあるが、その評価結果は時間分解能や深部組織における感度・定量性に問題を抱えている^{43,44}。

また、腫瘍に生着した細菌はその後持続的に分裂増殖し、抗がんタンパク質を産生する。そのため、細菌が腫瘍内において活動を維持することは抗腫瘍効果の発揮に重要である。しかしながら、同一腫瘍内を長期的に観察し、細菌の動態を可視化する手法が確立されていないため、これらに関する評価は十分に行われていない。

こうした状況に鑑み、本章では、まず初期動態について時間分解能に優れ、深さ方向への感度や定量性の高い Positron Emission Tomography (PET) を用いた評価法の開発を試みた。さらに、組織深部を侵襲性低く蛍光イメージング可能なファイバー束型蛍光顕微内視鏡を用いて、腫瘍内での細菌の動態を可視化した。

第1節 生物学的吸着に基づく細菌の⁶⁴Cu 標識法の確立

PET は、深さ方向への高い感度や定量性、優れた時間分解能を持つことから、幅広い物質の体内動態解析に活用されている⁴⁵⁻⁴⁷。細胞の動態評価にも実績があり、例えば 2-[¹⁸F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose で標識したヒト間葉系細胞 hMSCs の、ラット脳内移植後の生着や動態を評価した例などが報告されている⁴⁸。しかし、細菌を直接ポジトロン核種で標識する方法が十分に検討されていないことが原因で、細菌の動態評価への活用はなされていない。

細菌は、膜上のタンパク質や糖鎖を介して重金属イオンを吸着する生物学的吸着特性をもち、重金属汚染した水や土壌の浄化にも利用されている^{49,50}。Cu²⁺は、細菌にとって必須微量元素であり、細菌に吸着することが報告されている⁵¹。またその放射性同位体として、⁶⁴Cu が存在する。そこで本節では、細菌のポジトロン核種標識法を確立することを目的とし、Cu²⁺の細菌への吸着を利用した⁶⁴Cu 標識を検討した。

1-a 細菌の ^{64}Cu 標識条件の検討

^{64}Cu 標識に適した反応条件を大腸菌を用いて検討した。反応溶液として4種類のバッファ（Acetate buffer、PBS、HBSS、生理食塩水）を用意した。バッファ中で 1.3×10^8 CFUの大腸菌を約 50 MBq の $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ と混合し、室温にて5分間インキュベートしたのち、遠心と反応溶液と同一バッファへの再懸濁を繰り返して余剰の ^{64}Cu を洗浄した。その結果、HBSS もしくは生理食塩水を用いた際に約 40%の標識効率が確認された。PBS 使用時には標識効率が大幅に低下し、約 10%であった (Fig. 14A)。さらに生理食塩水を用いて標識反応時間を検討した結果、5 min 及び 20 min において標識効率に有意差はなかった (Fig. 14B)。また WST アッセイより、各バッファ中での大腸菌の生物活性を評価した。その結果、Acetate buffer を除く各バッファ中での生物活性は LB 培地中とほぼ同等であった。(Fig. 14C)。以上の結果をふまえ、以降の標識条件として生理食塩水中で5分間のインキュベーションを採用した。

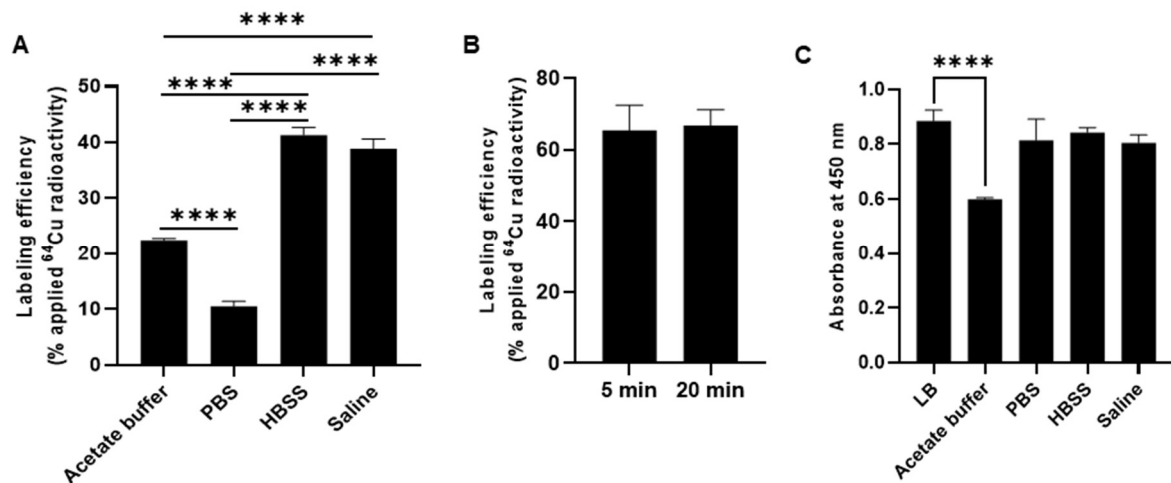


Fig. 14. Optimization of *E. coli* labeling conditions with ^{64}Cu .

(A) The labeling efficiency of *E. coli* (1.3×10^8 CFU) with approximately 50 MBq of $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ in acetate buffer pH 7.0, PBS, HBSS, or saline for 5 min. (B) The labeling efficiency after 5 min and 20 min incubations of *E. coli* (3.0×10^8 CFU) with the same radioactivity of $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ as above in saline. (C) WST assay of *E. coli* after 2 h incubation in LB medium or each buffer. **** $P < 0.0001$. Each value represents the mean \pm SD ($n = 3$).

1-b 細菌の ^{64}Cu 標識メカニズムに関する検討

トリプシン (0.5 g/L) 中で 37°C 、5分間インキュベーション処理を施し、膜タンパク消化を行った場合には、大腸菌の ^{64}Cu 標識効率が 99%以上低下した (Fig. 15A)。この結果より、大腸菌の ^{64}Cu 標識には膜タンパクが大きく関与していることが示唆された。一方で

^{64}Cu 標識後に大腸菌をトリプシンで処理した際に解離した ^{64}Cu は約 50%であった (Fig. 15B)。

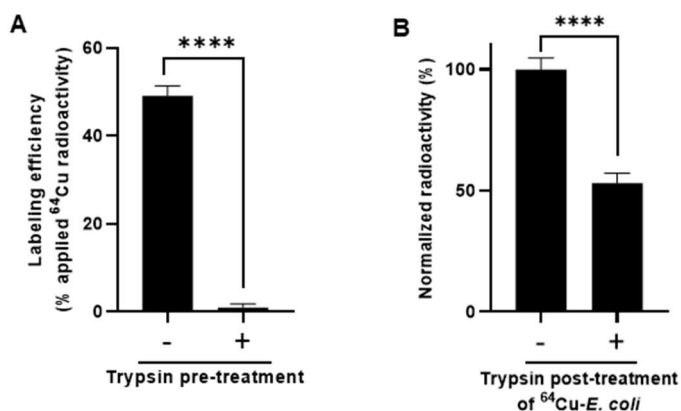


Fig. 15. The effects of cell-surface protein shaving.

(A) Labeling efficiency of *E. coli* pre-treated by trypsin (2.3×10^8 CFU). (B) The rate of radioactivity remained after trypsin post-treatment of ^{64}Cu -*E. coli* $***P < 0.001$; $****P < 0.0001$. Each value represents the mean \pm SD ($n = 3$).

次に、標識と同時に金属カチオンを混合することで標識競合阻害実験を行った。1 mM の非放射活性 Cu^{2+} の存在下で標識効率 は 90%低下したが、その他の金属カチオン Ag^+ 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} の共存下では、有意な標識阻害は観察されなかった (Fig. 16A)。最後に、熱不活化により代謝活性を低下させた大腸菌の標識実験を行った。55 °C もしくは 75 °C で 15 分間の熱処理を施しても、大腸菌の標識効率に変化はなかった (Fig. 16B)。

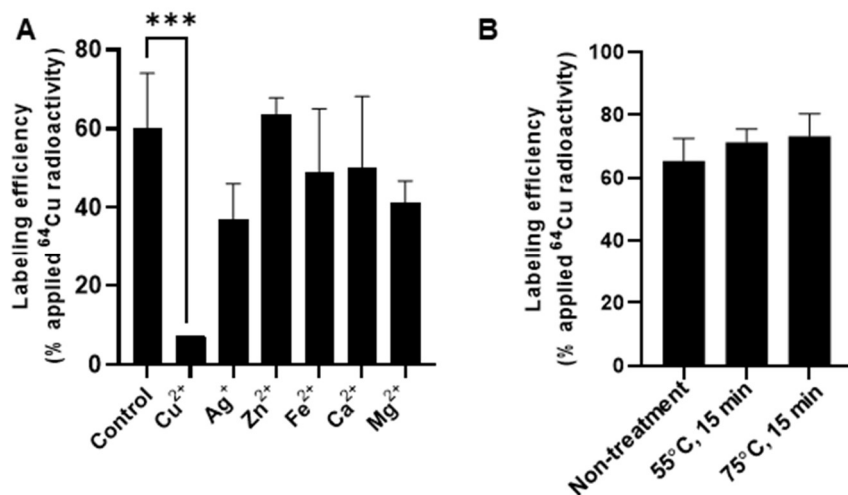


Fig. 16. The effects of competitive inhibition, and heat inactivation on the labeling efficiency.

(A) Comparison of labeling efficiencies under the co-incubations with 1.0 mM solutions of different cationic ions (CuCl_2 , AgCl , ZnCl_2 , FeCl_2 , CaCl_2 and MgCl_2) for 2.5×10^8 CFU of *E. coli*. (B) Labeling efficiency of heat-inactivated *E. coli* for 15 min at 55 °C and 75 °C (1.8×10^8 CFU). $***P < 0.001$; $****P < 0.0001$. Each value represents the mean \pm SD ($n = 3$).

1-c 細菌種による ^{64}Cu 標識効率比較

本標識法の細菌種の適応範囲について検討するため、膜構造の異なるグラム陰性菌（大腸菌、*Bacteroides vulgatus*）と、グラム陽性菌（*Blautia coccooides*、*Bifidobacterium longum*）に対する標識を行ったところ、全ての細菌種の標識が可能であった。標識効率は細菌種によって17%（*Blautia coccooides*）から77%（*Bacteroides vulgatus*）と大きく異なったが、その原因に関してグラム陽性・陰性との関係は認められなかった（Fig. 17）。大腸菌の標識効率は約50%であり、これらの細菌種の中では平均的であった。

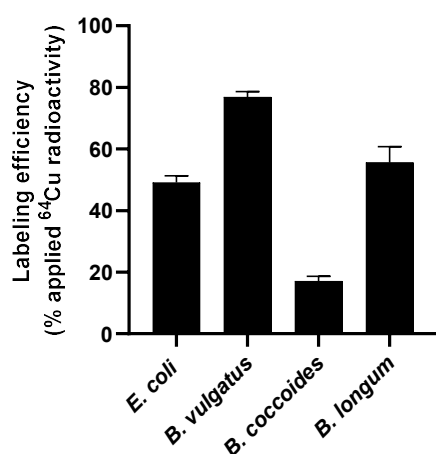


Fig. 17. ^{64}Cu -labeling of different gram-positive and gram-negative bacteria.

The efficiencies of *E. coli* (3.9×10^8 CFU), *B. vulgatus* (1.5×10^8 CFU), *B. coccooides* (2.0×10^8 CFU), and *B. longum* (1.6×10^8 CFU) with 50 MBq of [^{64}Cu]CuCl₂. Each value represents the mean \pm SD ($n = 3$).

第2節 大腸菌の静脈内投与後の体内動態評価

本節では、生物学的吸着特性に基づき標識した ^{64}Cu 標識大腸菌を用いて、静脈内投与後の初期体内動態、及びその投与量依存性を PET ダイナミックイメージングにより評価した。

2-a 生体内標識安定性の向上に関する検討

1-a で得られた ^{64}Cu 標識大腸菌を、50%血清中で 37°C 、15 分間インキュベートすると、約 60%の ^{64}Cu が解離した（Fig. 18C）。解離の原因は、バッファーによる洗浄精製が不十分で、細菌膜上に弱く結合した [^{64}Cu]Cu²⁺ が血清中に含まれるタンパク質に移行したと考えられたため、ペプチド成分を多く含み、かつ細菌の生命活動への影響が小さいと予想される LB 培地を用いて精製を試みた。 37°C の LB 培地中で ^{64}Cu 標識大腸菌を 3 分間インキュベートし、遠心により洗浄した結果、37%の ^{64}Cu が上清より検出された。本作業を繰り返す

ことで上清に解離する ^{64}Cu の割合は徐々に低下し、5回の精製を終えて6.8%まで減少した (Fig. 18B)。得られたLB精製 ^{64}Cu 標識大腸菌の血清中の標識安定性は、90%まで向上した (Fig. 18C)。

LB培地による精製が大腸菌に及ぼすダメージを評価するため、精製前後の大腸菌の増殖を放射性非標識下で比較したところ、ほぼ同等の増殖曲線を描いた (Fig. 18D)。また、LB精製を終えた ^{64}Cu 標識大腸菌の生物活性は、非標識大腸菌と比較して僅かに低下したものの有意な差はなかった (Fig. 18E)。これより、一連の ^{64}Cu 標識過程による大腸菌への深刻なダメージはないと考えられる。

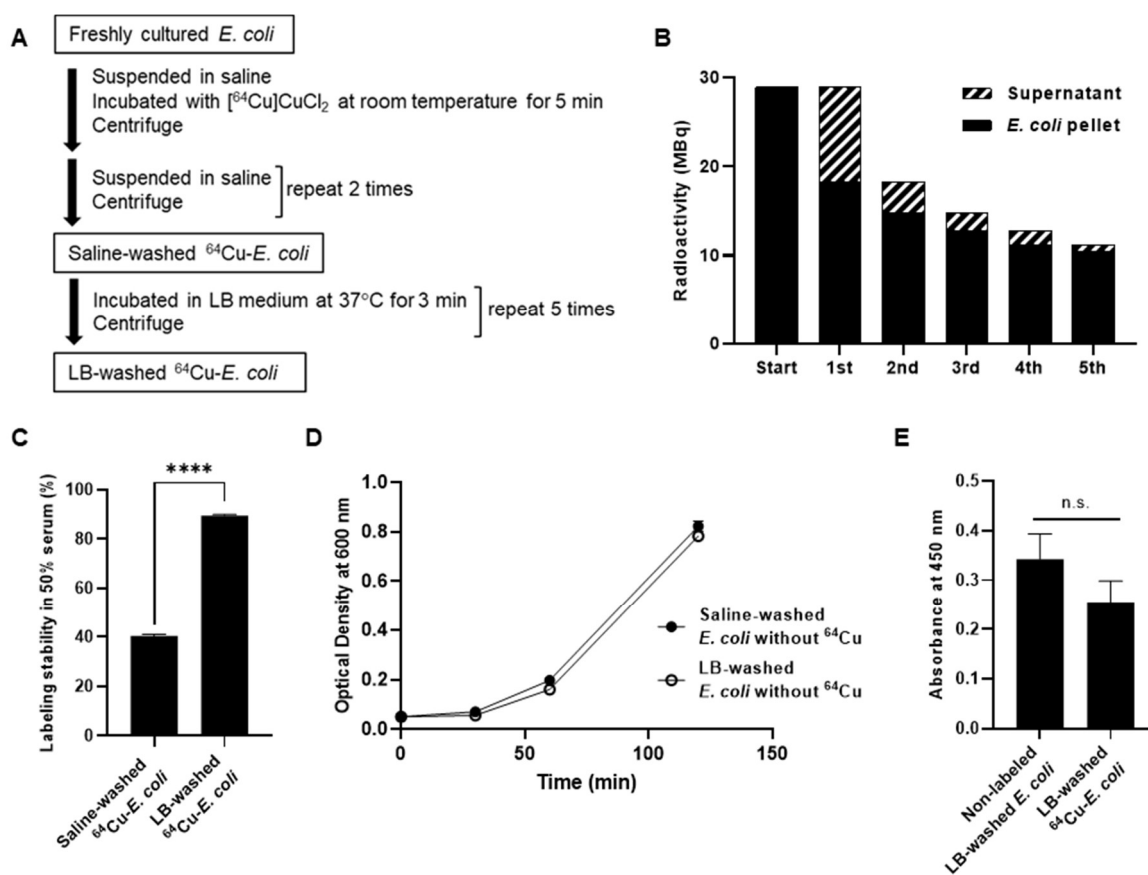


Fig. 18. Purification for *in vivo* administration.

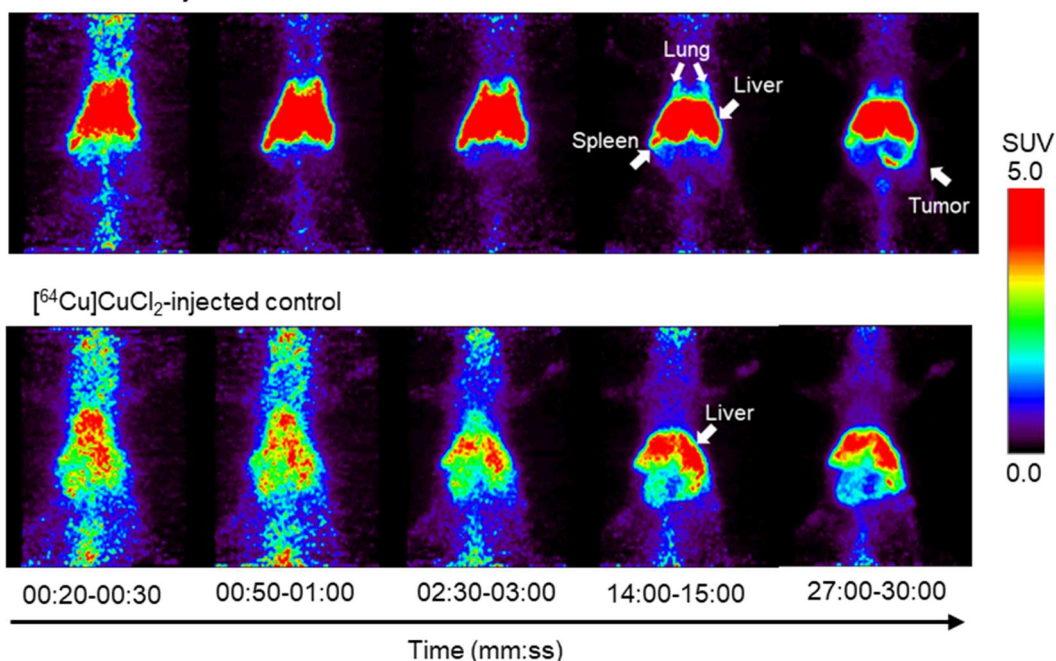
(A) The experimental protocol for preparation of LB-washed ^{64}Cu -*E. coli*. (B) The radioactivity of supernatants and *E. coli* pellets after every LB wash. Each value represents the mean ($n = 3$). (C) Labeling stability of saline-washed ^{64}Cu -*E. coli* and LB-washed ^{64}Cu -*E. coli* in 50% serum for 15 min at 37 °C. **** $P < 0.0001$. Each value represents the mean \pm SD ($n = 3$). (D) Growth of saline-washed *E. coli* (closed circles) and LB-washed *E. coli* (open circles). Each value represents the mean \pm SD ($n = 3$). (E) WST assay of LB-washed ^{64}Cu -*E. coli* compared with the non-labeled, LB-washed *E. coli* that is only except for the addition of ^{64}Cu CuCl₂. Each value represents the mean \pm SD ($n = 3$). n.s., not significant.

2-b ^{64}Cu 標識大腸菌の PET イメージング

^{64}Cu 標識大腸菌の colon-26 担がんマウス尾静脈内投与後の初期体内動態をダイナミック PET イメージングにより評価した。Maximum intensity projection (MIP) 画像及び、心臓、肝臓、肺、脾臓の組織内放射能の time-activity curve (TAC) 解析の結果、 ^{64}Cu 標識大腸菌は投与後速やかに血中より除去され、初期分布相は数分のうちに終了することが明らかとなった (Fig. 19A-B)。主たる大腸菌の集積臓器は肺及び肝臓であったが、その TAC は大きく異なった。肺への集積は投与後 15 秒ほどでピークを迎え、その後 10 分ほどかけて徐々に減少した。一方肝臓の放射活性は投与後 3 分でピークに達し、その後維持された。投与後 30 分において摘出臓器から検出された放射能の分布は、肝臓は 60 %ID である一方で、肺は 4 %ID に留まったことより、大腸菌の投与直後における肺での一過性の蓄積とその後の肝臓への集積が明らかとなった (Fig. 19C)。また、MIP 画像において腫瘍は確認されず、投与後 30 分の時点で腫瘍に集積した ^{64}Cu 大腸菌は投与細菌の 1 %以下であった。一方、 ^{64}Cu 標識大腸菌投与群において、その放射能分布のプロファイルは ^{64}Cu 標識大腸菌と大きく異なっていた。 ^{64}Cu の肺への初期集積は観察されず、肝臓への集積が徐々に上昇していく様子が観察された。

加えて、CFU カウントに基づいた大腸菌の体内分布も評価した (Fig. 19D)。これは、コロニーを形成した大腸菌数を評価するものであり、大腸菌の生存の程度を反映する。投与 5 分後においては、放射能に基づく評価と同様、大部分の大腸菌の肝臓及び肺への集積が観察された。一方 2 時間後には、肝臓に残存する大腸菌は 1/5、肺に関しては 1/100 以下にまで減少した。

A ^{64}Cu -*E. coli*-injected



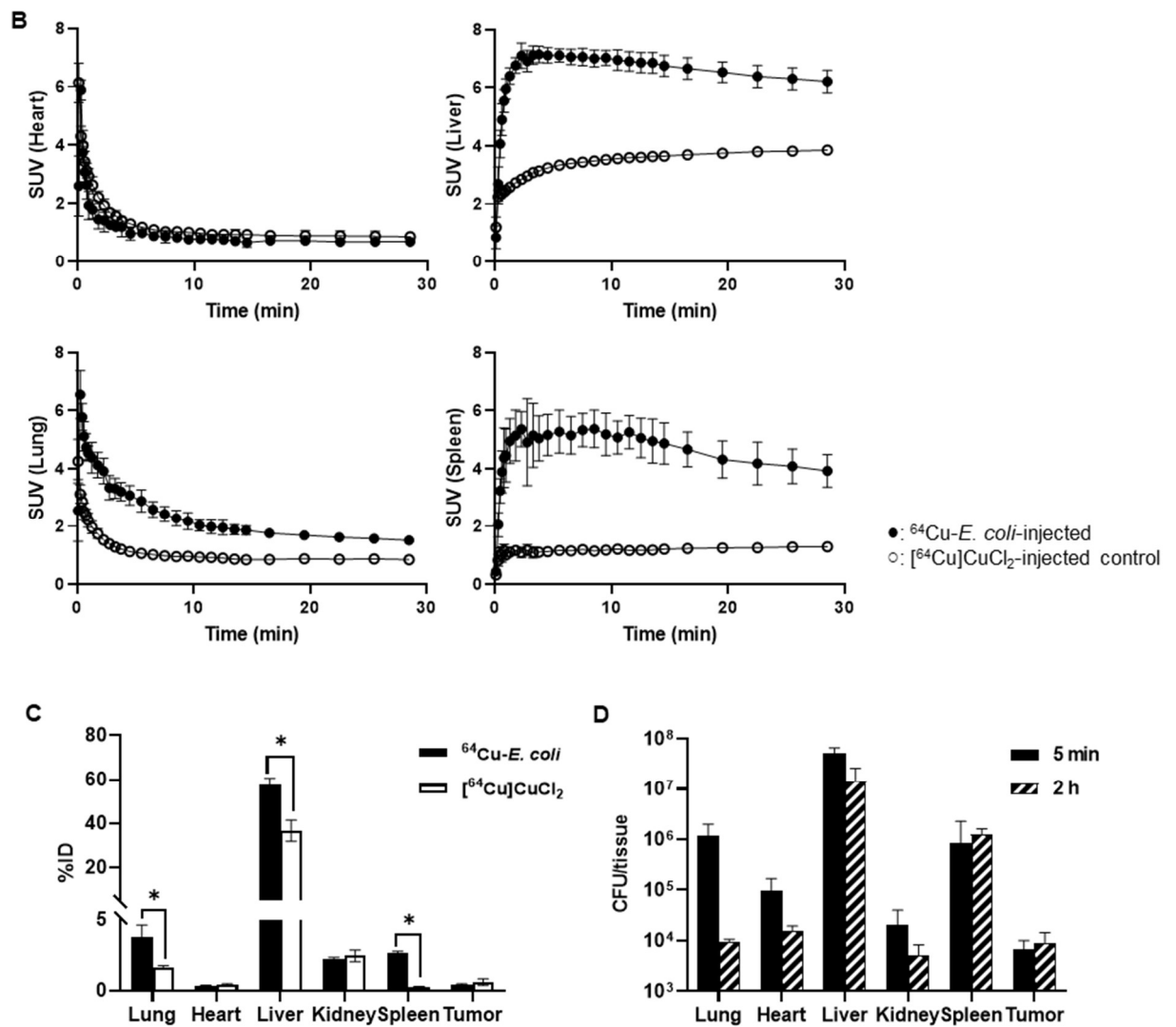


Fig. 19. Dynamic PET imaging of the LB-washed ^{64}Cu -*E. coli*.

(A) Representative maximum intensity projection PET images over 30 min for colon-26 tumor-bearing mice receiving ^{64}Cu -*E. coli* (~ 5 MBq, $\sim 1 \times 10^8$ CFU) and ^{64}Cu] CuCl_2 (~ 6 MBq). (B) Time-activity curves for the heart, liver, lung, and spleen in ^{64}Cu -*E. coli*-injected (closed circles) and ^{64}Cu] CuCl_2 -injected control (open circles) groups. Each value represents the mean \pm SD ($n = 3-4$). Error bars smaller than the symbols are not shown. (C) Radioactivity distribution data measured *ex vivo* at approximately 30 min. $*P < 0.05$. Each value represents the mean \pm SD ($n = 3-4$). (D) Biodistribution determined by CFU counting in colon-26 tumor-bearing mice receiving nonradioactive *E. coli* ($\sim 2 \times 10^7$ CFU) at 5 min and 2 h. Each value represents the mean \pm SD ($n = 3-4$).

2-c 投与細菌数依存的な大腸菌の体内分布

2-a において、静脈内投与大腸菌の一時的な肺への塞栓と肝臓への集積が明らかとなった。そこで、これらの生体内分布が投与細菌数に応じてどのように変化するか、low-dose (8.9×10^5 CFU)、medium-dose (2.3×10^7 CFU)、及び high-dose (5.6×10^8 CFU) の大腸菌を投与することで評価した (Fig. 20)。肺への集積が投与直後の一時的な現象であることから、 ^{64}Cu 標識大腸菌投与後 1 分で血液、肺、肝臓、脾臓を回収し、それぞれの組織内放射能を測定した。その結果、血液、肝臓、脾臓においては投与菌体数に応じた集積の変化は見られなかった。一方肺への集積は、high-dose 投与時において、有意差こそなかったが、low-dose 投与時の約 2 倍となった。

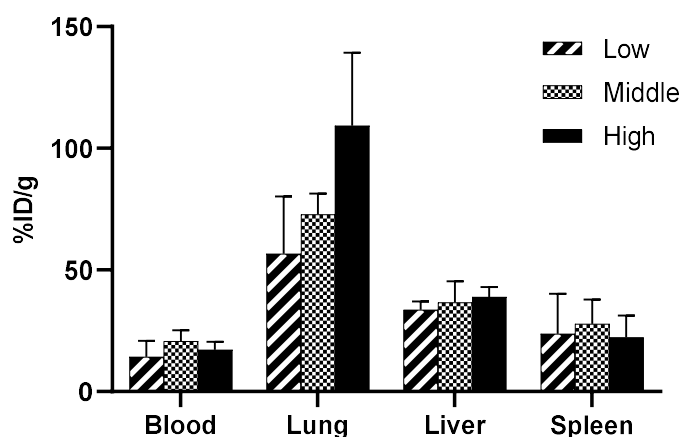


Fig. 20. Dose dependency of ^{64}Cu -*E. coli* biodistribution at 1 min after injection. Radioactivity distribution data measured *ex vivo* for the blood, lungs, livers, and spleens of mice with the low-dose (8.9×10^5 CFU), medium-dose (2.3×10^7 CFU), and high-dose (5.6×10^8 CFU). Each value represents the mean \pm SD ($n = 6-8$).

第 3 節 大腸菌の腫瘍内での動態及び変性に関する評価

腫瘍内における細菌の観察は、ほとんどが腫瘍切片の組織染色や摘出した腫瘍の蛍光イメージングによって行われてきた。生体内でのライブイメージングとしては、Hoffman らの研究チームによる多光子励起顕微鏡を用いた先駆的な蛍光イメージングが報告されているが、その組織透過の深度は数百マイクロメートルが限界である⁵²。これに対して、Funabiki らの開発したファイバー束型蛍光顕微内視鏡システムは、直接臓器内に顕微内視鏡プローブを刺入することで、侵襲性低く深部組織の観察が可能である⁵³。マウス脳深部にプローブを刺入し、行動制限なくライブイメージングを行うことで、蛍光タンパク質標識したニューロンやその Ca^{2+} イオン応答の可視化にも成功している⁵⁴。このシステムを応用することで、腫瘍表面から数ミリを超える深部領域に生着した大腸菌の *in vivo* 観察が可能であると考えた。

そこで本節では、このファイバー束型蛍光顕微内視鏡を用いて、腫瘍内で増殖した蛍光タンパク質発現大腸菌の動態を、同一マウスにおいて経日的に観察した。さらに、腫瘍内で増殖した大腸菌が保有していたプラスミド数を定量し、蛍光タンパク質発現とプラスミド維持に関する評価を行った。

3-a 蛍光顕微内視鏡を用いた腫瘍内生着大腸菌のタイムラプスイメージング

緑色蛍光タンパク質 ZsGreen を発現した大腸菌は、colon-26 担がんマウスに静脈内投与された後、腫瘍内に生着し、3~7 日間で 10^{8-9} CFU/tumor まで増殖した (Fig. 21)。

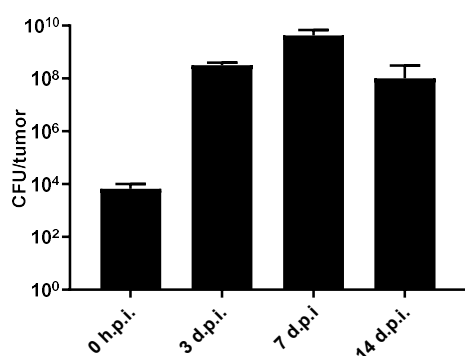


Fig. 21. *E. coli* colonization in tumor after intravenous injection.

The number of bacteria was determined by CFU counting at 0 h, 3 d, 7 d, and 14 d from intravenous injection of *E. coli* (1.8×10^7 CFU). Each value represents the mean \pm SD ($n = 4$).

そこで、腫瘍内で増殖した大腸菌の動態を、ファイバー束型蛍光顕微内視鏡を用いた蛍光観察によって評価した。緑色蛍光タンパク質 ZsGreen を発現した大腸菌を colon-26 担がんマウスに静脈内投与した。前述のように投与3日後には腫瘍内で大腸菌が十分増殖していたことから、観察は大腸菌投与から3、7、14日後に実施した。腫瘍を固定し、蛍光顕微内視鏡プローブを刺入してイメージングを行ったところ (Fig. 22)、投与3日後の時点から大腸菌のコロニー由来と考えられる蛍光が観察された。蛍光が見られるエリアは経日的に増加し、投与から14日が経過した後も広い範囲で ZsGreen の蛍光が確認された (Fig. 23)。

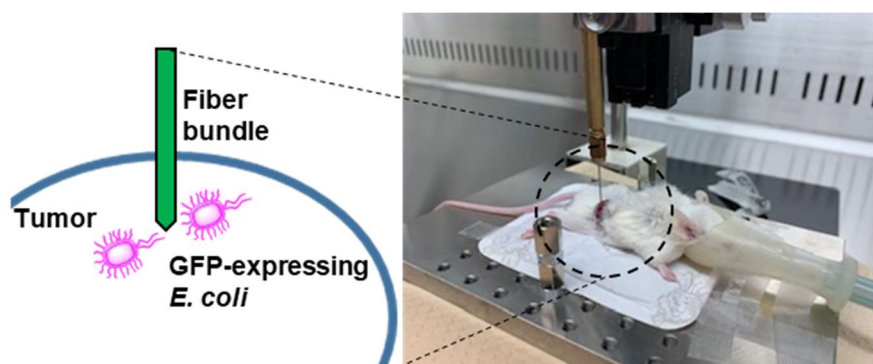


Fig. 22. Method of fluorescence imaging in tumor by micro-endoscope.

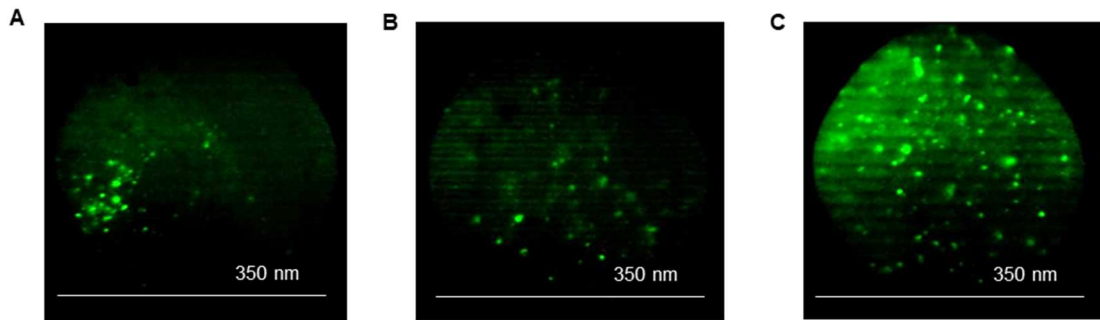


Fig. 23. Micro-endoscope fluorescence image of ZsGreen-expressing *E. coli* colonized in tumor. Tumor of the same mouse was observed at (A)3, (B)7, and (C)14 days after intravenous injection of *E. coli* (6.7×10^7 CFU). ZsGreen was excited at 488 nm.

また、プローブを固定して定点におけるタイムラプスイメージングを行ったところ、投与7日後にも大腸菌が細かく動く様子が観察された (Fig. 24)。本章で使用した蛍光顕微内視鏡の視野は直径約 $350 \mu\text{m}$ であることから、大腸菌は数分間に $10 \mu\text{m}$ 程度動いているものと測量される。

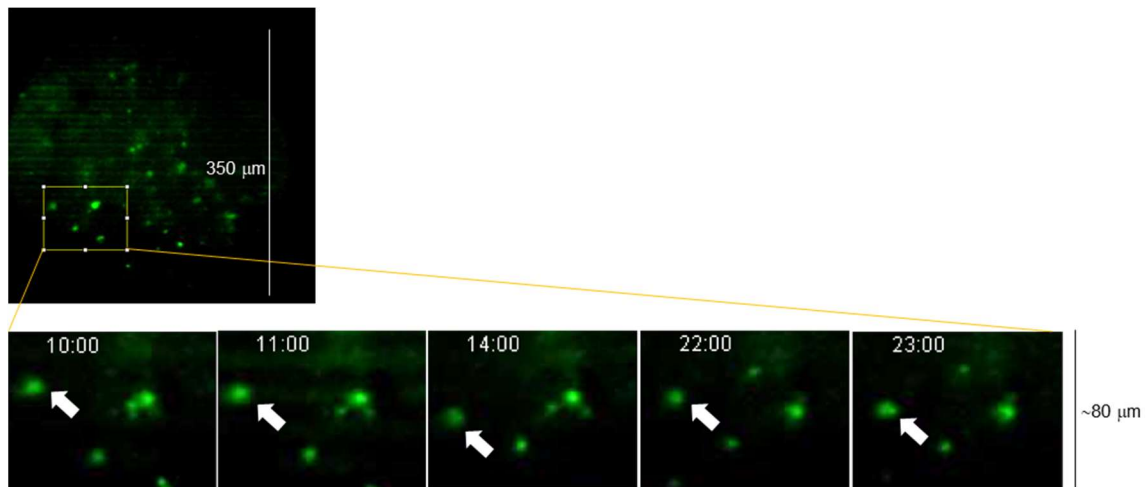


Fig. 24. Time-lapse imaging of intratumor dynamics of ZsGreen-expressing *E. coli* at 7 d.p.i. Typical area and time-points with significant *E. coli* activity were extracted and displayed. The number in the upper left corner indicates the elapsed time (min:sec).

3-b 腫瘍内生着大腸菌の保有プラスミド維持に関する評価

3-a において大腸菌投与から 14 日後も腫瘍内で動的に動く蛍光タンパク質 (ZsGreen) が観察されたことから、大腸菌が蛍光タンパク質を産生し続けていると考えられる。そこで、腫瘍内に生着している大腸菌が保有するプラスミド数 (pZsGreen) を評価した。pZsGreen に対する定量 PCR により、腫瘍ホモジネート中に含まれる全プラスミド数を算出し、腫瘍内の大腸菌細菌数をホモジネートの寒天培養により CFU に基づいて測定した。(Fig. 25A) これに基づき、大腸菌 1 菌体当たり保有するプラスミド数をプラスミドコピー数として算出した。その結果、投与後 7 日目時点で約 300 コピーを保有しており、投与後 14 日目においても、バラつきこそ大きいものの平均して約 300 コピーを維持していた (Fig. 25B)。これにより、腫瘍内に生着した大腸菌が 2 週間に亘ってプラスミドを維持していることが示唆された。

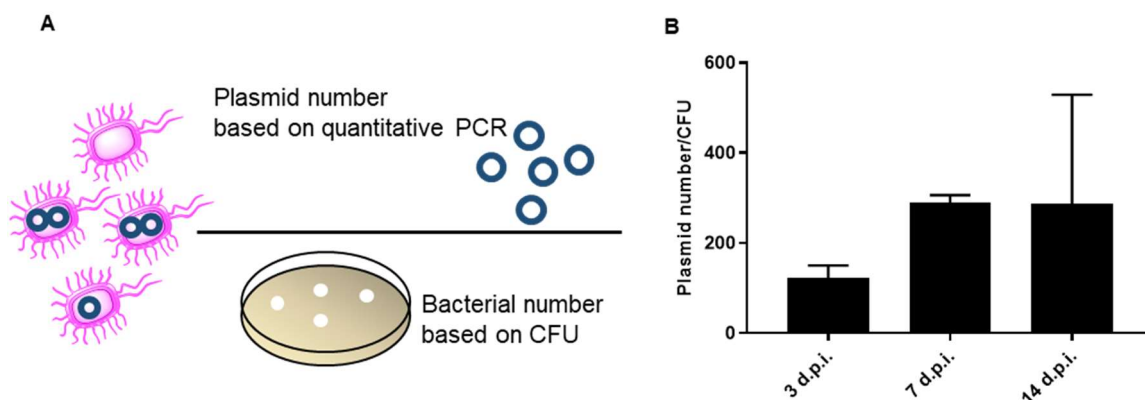


Fig. 25. Evaluation of the number of plasmids possessed per unit *E. coli*.

(A) Method of calculating the number of plasmids possessed by *E. coli*. (B) The number of plasmids (pZsGreen) possessed by tumor-associated *E. coli* in colon-26 tumor-bearing mice receiving ZsGreen-expressing *E. coli* (3.1×10^7 CFU). Each value represents the mean \pm SD ($n = 3$).

第4節 考察

本章では、細菌の重金属イオンに対する生物学的吸着特性を利用することで、グラム陽性菌・陰性菌を問わず迅速かつ高効率な ^{64}Cu 放射性標識が可能であることを明らかにした。さらに、得られた ^{64}Cu 標識大腸菌のダイナミック PET イメージングにより、担がんマウスにおける細菌の初期体内動態について評価した。加えて、ファイバー束型蛍光顕微内視鏡による腫瘍内部の蛍光イメージングにより、腫瘍内に生着した大腸菌が2週間に亘って活動を維持していることを明らかにした。

グラム陰性のシュードモナス菌やグラム陽性のバシラス菌は、1-10 mM の Cu^{2+} を含む溶液中にインキュベートされた際、25°C の条件下で10分間以内に80-90%の Cu^{2+} を吸着することが報告されている^{55,56}。本章で確立された各種細菌の ^{64}Cu 標識条件は、これらの環境微生物学分野における非放射活性 Cu^{2+} の吸着条件とよく一致していた (Fig. 14)。さらに本章では、特にグラム陰性の大腸菌を対象として、 Cu^{2+} との相互作用をより詳細に検討した。トリプシンシェービングは、プロテオミクス分析などにおいて細菌や哺乳類細胞の表面タンパクの消化に用いられる手法である⁵⁷⁻⁵⁹。このトリプシンシェービングにより前処理した大腸菌の標識効率が99%以上低下したことから、 ^{64}Cu は細菌膜表面のタンパク質との相互作用を主たるメカニズムとして標識されていると示唆された (Fig. 15A)。一方、トリプシンシェービングを ^{64}Cu 標識後に行った際に、約50%の ^{64}Cu が大腸菌上に残存した現象に関しては (Fig. 15B)、 Cu^{2+} との相互作用によって大腸菌膜上のタンパク質が構造変化を起こし、その結果トリプシンによる消化を受けにくくなったことが一因であると考えられる^{60,61}。

過剰量の非放射活性 Cu^{2+} の存在下における ^{64}Cu 標識の大幅な阻害は、細菌膜表面に Cu^{2+} の特定の結合サイトが存在することを示唆している (Fig. 16A)。電子スピンを用いた過去の検討から、大腸菌の膜タンパク質内のカルボキシル基に Cu^{2+} が結合することが報告されている^{62,63}。またその他にも、リポ多糖やリン脂質中のリン酸基が主要な Cu^{2+} 結合サイトであることが指摘されている^{50,64}。本標識において、 $[\text{Cu}^{64}]\text{Cu}^{2+}$ がこれらの結合サイトを介して吸着している可能性が高い。一方で、 Ca^{2+} や Mg^{2+} といった2価のカチオンや Ag^+ も大腸菌に吸着することが報告されているが^{65,66}、 Cu^{2+} 以外の重金属イオンの ^{64}Cu 標識の阻害作用は弱かった。これは、本標識のインキュベーション条件下における、大腸菌と各種重金属イオンとの親和性を反映している可能性がある。

LB 培地を用いた繰り返し精製を行う前の血清中での標識安定性は40%であり (Fig. 18C)、これは精製によって解離した ^{64}Cu の割合が約60%であったこととよく対応する (Fig. 18B)。これらの結果から、 Cu^{2+} と大腸菌の相互作用には結合安定性の異なる少なくとも二つの結合様式の存在が示唆される。これは、上記の Cu^{2+} が配位する膜上の化学基の違いや、その配位サイトへの他のタンパク質の近づきやすさ、トランスキレーションの容易さなどに由来するものと推測されるが、これらの仮説を明らかにするには、更なる検討

が必要である。また大腸菌には、外膜を介した Cu^{2+} の細胞内輸送に働く OmpC ポーリンのようなエネルギー非依存的チャンネルが存在する。このことから、安定性の高い相互作用のもう一つのメカニズムとして、 Cu^{2+} の細菌内への流入が考えられる^{67,68}。しかしながら、熱処理を施し、膜構造を破壊することなくチャンネル機能を不活化した大腸菌においても ^{64}Cu 標識効率が低下しなかったことから (Fig. 16B)、本標識におけるトレーサードーズの $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$ では、チャンネルに媒介された Cu^{2+} の細胞内取り込みの寄与は限定的であると考えられる。

PET を用いた細菌の生体内分布評価法として、これまでに、腫瘍内に集積した Herpes Simplex Virus type 1 Thymidine Kinase (HSV1-TK) 発現細菌の放射性標識核酸アナログを用いた検出^{69,70} や、2-deoxy-2- ^{18}F fluorosorbitol を用いた細菌特異的糖代謝に基づく細菌の局在イメージングなどが報告されてきた^{71,72}。しかし、これらの方法はいずれも、細菌を直接ポジトロン核種で標識したのではなく、生体内に生着した後の細菌の局在を間接的に検出するものである。細菌自身をポジトロン標識した例としては、感染症に関する先行研究一例のみ報告がある⁷³。これは、*Francisella tularensis* や *Klebsiella pneumoniae* といった病原性細菌を、二官能性キレート試薬 (pyruvaldehyde-bis(N4-methylthiosemicarbazone)) で修飾し、それを介して ^{64}Cu 標識したものである。病原性細菌の感染経路に応じた生体内分布が、投与後複数のタイムポイントにおいて評価されている。しかしこの評価では、マウスの感染試験やがん治療研究における一般的な細菌投与量 (10^6 - 10^8 CFU/mouse) よりも高い投与量 (10^9 CFU/mouse) が使用されており、キレーターを介した標識法の比放射能が低いことが疑われる。これに対して、本章において得られた ^{64}Cu 標識大腸菌は、LB 培地による精製後でも 5-6 MBq/ 10^8 CFU の比放射能を有していた。これにより、PET イメージングに用いる菌体量を減少させることが可能であった。

大腸菌の全身投与後、生体分布相は数分で終了した。一方、 ^{64}Cu 標識大腸菌を 37°C 血清中で 15 分間インキュベートしても 90% の標識安定性が保持されることから (Fig. 18C)、初期動態の評価において ^{64}Cu 標識が十分に安定であったことが推察される。これは、 ^{64}Cu 標識大腸菌の分布プロファイルと ^{64}Cu 単体の分布プロファイルが大きく異なっていたことから裏付けられる (Fig. 19A)。また、 ^{64}Cu 標識後、大腸菌の生存率が有意に低下していないことから、標識操作が大腸菌の生物活性に与える影響は小さいものと考えられる (Fig. 18D, E)。これらの結果を併せて、本章において大腸菌の初期体内動態が適切に評価されたものと考えられる。

これまで、細菌の生体内分布はコロニーカウント法^{23,25} や生物発光・蛍光イメージング^{44,74} などを用いて評価されていた。しかし、コロニーカウント法で定量されるのは生体内における生細菌のみである。また、生物発光や蛍光イメージングは深部組織での検出感度や定量性に問題を抱えていた。PET イメージングにより観察された迅速な血中クリアランスや肝臓への集積は (Fig. 19)、従来の CFU カウント法や生物発光イメージングに基づく大腸菌の生体内分布評価の結果と一致していた^{23,44}。PET において肝臓への放射能分布が

維持されるのに対して、CFUに基づく評価では大腸菌の菌体数が時間経過に伴い減少した。これは、体内で大腸菌が細網内皮系による貪食を受けたことを反映しているものと考えられる (Fig. 19B, D)。また、ダイナミック PET イメージングにより、投与5分後における一時的な肺への大腸菌集積を観察した。生物発光や蛍光イメージングでは、肺より検出されるシグナルが低いことに加え、投与直後の体内分布は十分に評価されてこなかった。そのため、生菌製剤の投与直後の肺への分布はこれまで示されていない。しかし、その他の細胞製剤の体内動態研究などにおいては、肺への高い集積が観察されている。例えば、^{99m}Tc 標識された骨髄由来間葉系肝細胞の動態評価では、静脈内投与後、細胞の約50%が肺に集積・残存していた⁷⁵。粒子径が数 μm を超えるような粒子は、静脈内投与された際に肺の毛細血管に塞栓し、その全身への分布は制限されることに知られている^{76,77}。同様の塞栓が、大腸菌の組織分布においても投与量依存的に起きた可能性が高い。しかし、大腸菌のサイズが2-4 μm と細胞などに比べて小さいことから、塞栓は一時的であったと考えられる。

PET イメージングにおいて、腫瘍への大腸菌の集積は検出できなかった。CFUに基づく定量結果においても、投与直後に腫瘍内から検出された大腸菌は投与細菌数の0.1%程度であることから、腫瘍へ到達する大腸菌はごくわずかであることが示唆される (Fig. 19D, 21)。しかし、腫瘍内に生着後、3日間で10000倍以上増殖し (Fig. 21)、投与後2週間の時点で顕微内視鏡の視野全体に広く生着していた (Fig. 23)。腫瘍に到達する細菌数は少なくとも、生着後に高い増殖能を発揮することにより、抗腫瘍効果に繋がるものと期待される^{2,78-82}。また、タイムラプスイメージングより、投与後7日後の大腸菌が数分間で10 μm 程度動いている様子が観察された。大腸菌は鞭毛を有し、チャンバ内で毎秒数 μm の運動能を示すことが報告されている⁸³。これと比較すると、腫瘍内における運動能の低下が示唆されるが、腫瘍内で大腸菌が1-2週間に亘って活動を維持していることが明らかとなった。

遺伝子改変を施したがん治療用生菌製剤の開発においては、細菌が安定に腫瘍内で治療タンパク質を発現し続けることが不可欠である。しかしながら、細菌が増殖を繰り返す間にプラスミドを欠落する可能性は否定できない。本検討の結果、腫瘍から回収した大腸菌は2週間に亘りハイコピー相当のプラスミド数を維持していることが確認された (Fig. 25)。用いた ZsGreen 発現プラスミド (pZsGreen) は、複製起点 ColE1 を有するハイコピープラスミドであり、コピー数は約500程であるとされていることから、算出されたコピー数は妥当な数値であると考えられる。加えて、投与14日目にも蛍光タンパク質が腫瘍内に広く確認されていることから、大腸菌がプラスミドを維持し、蛍光タンパク質を産生している可能性が示唆された。

以上、本章では、細菌のもつ重金属イオンに対する生物学的吸着特性を用いて、細菌を直接⁶⁴Cu 標識する手法を確立した。標識は膜構造に依らずグラム陰性・陽性菌共に可能であったことから、本標識法の汎用性の高さが示された。また、得られた⁶⁴Cu 標識大腸菌の

PET イメージングに成功し、投与された大腸菌の一時的な肺への塞栓や、肝臓への集積など初期動態に関する新たな知見を得た。さらに、ファイバー束型蛍光顕微内視鏡を用いることで、同一マウスの腫瘍深部を経日的な観察を可能にした。その結果、投与後2週間にわたって大腸菌が活動を維持していることが分かり、タンパク質を産生している可能性も示唆された。がん治療用生菌製剤の治療効果は、腫瘍内における細菌自身の生命活動やタンパク質産生能に依存する。従って、本システムが今後抗腫瘍効果の評価検討を行う上で有用なモダリティとなることが期待される。

結論

以上、筆者は2章にわたり、がん治療用生菌製剤の開発における、高い腫瘍内増殖能と安全性を両立する細菌種の選択肢拡大、及び、静脈内投与した細菌の全身及び腫瘍内動態評価に関する検討を行い、以下の結論を得た。

第1章 腫瘍内増殖を指標とした細菌種選別法の確立と *Blautia coccooides* の有用性評価

腫瘍内増殖能を有する細菌種の選別を可能にするため、細菌の 16srDNA 配列に対するダイレクトコロニーPCR によって腫瘍内の細菌種を同定する手法を確立した。熱処理と組織破碎用ガラスビーズを用いた溶菌により、ペプチドグリカン層からなる強固な膜構造を有するグラム陽性菌のコロニーダイレクト PCR に成功した。本手法を用いて、腫瘍内で増殖した *Blautia coccooides* 及び *Bacteroides vulgatus* をそれぞれ同定することができた。更に、両細菌種が腫瘍内増殖能を有することも明らかとなった。また、*B. coccooides* に関する詳細な検討から、本菌が腫瘍選択的な増殖を示すことを見出した。さらに本菌は、静脈内投与時の炎症性サイトカインの産生量や体重変動などの宿主免疫賦活作用が軽微であった。これらの結果より、*B. coccooides* が高い腫瘍内増殖と低い免疫原性を両立する、がん治療用生菌製剤の有用菌種候補であることが明らかとなった。

第2章 静脈内投与した細菌の全身及び腫瘍内における動態評価

細菌の重金属イオンに対する生物学的吸着特性を応用し、細菌の ^{64}Cu 標識法を確立した。生理食塩水中、室温で5分間 ^{64}Cu と混合するだけで、細菌はその膜構造に依らず容易に標識された。さらに標識メカニズムに関する検討の結果、 ^{64}Cu は細菌膜上のタンパク質を介して Cu^{2+} 特異的に吸着していることが示唆された。LB 培地を用いて繰り返し精製を行うことで生体内での標識安定性は90%に向上し、これを受けてPETを用いた大腸菌の初期体内動態評価に成功した。PETイメージングにより、静脈内投与された大腸菌の一時的な肺への塞栓や、肝臓への集積など初期動態に関する知見を得た。

また、ファイバー束型蛍光顕微内視鏡を用いて、腫瘍内で生着した細菌の動態評価を行った。マウスの腫瘍深部で増殖した *ZsGreen* 発現大腸菌の蛍光イメージングを行い、同一マウスの腫瘍内での大腸菌の挙動を経日的に観察することに成功した。その結果、*ZsGreen* 発現大腸菌は投与後2週間間に視野全体に広く増殖し、投与1-2週間後も活動を維持していることが明らかとなった。がん治療用生菌製剤の治療効果は腫瘍内における細菌自身

の活動やタンパク質産生能に依存することから、本システムが抗腫瘍効果の評価検討を行う上で有用なモダリティとなることが期待される。

以上、本研究では、腫瘍内増殖を指標とした有用細菌の選別につながる、遺伝子改変を伴わない腫瘍内細菌の同定法を確立した。また、確立した手法を用いて、腫瘍内増殖と低い免疫原性を両立する有用細菌種候補、*Blautia coccooides* を提案した。加えて、細菌のポジトロン核種 (^{64}Cu) 標識法を確立し、静脈内投与した細菌の全身初期動態を評価した。さらに、腫瘍深部に生着した細菌の経日的観察に成功し、細菌の腫瘍内動態評価を可能にする新規のモダリティを提示した。本研究は、がん治療用生菌製剤の開発を進める上で、生菌自身の安全性・有効性の評価において有益な指針を提供するものであると期待される。

謝辞

終わりに臨み、本研究に際して終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科 山下 富義教授に忠心より深甚なる謝意を表します。

また、終始懇切なる御指導を賜りました京都大学大学院薬学研究科 樋口 ゆり子 准教授に謹んで深く感謝の意を表します。

更に、多くの有益なるご助言、ならびにご指導を賜りました理化学研究所 分子送達・イメージング技術研究チーム 向井 英史チームリーダーに深く感謝の意を表します。

また、ご指導、ご助言を賜りました理化学研究所 渡辺 恭良チームリーダー、辨野 義己特別招聘研究員、片岡 洋祐チームリーダー、船曳 和夫客員主管研究員に深く感謝の意を表します。

併せて、京都大学大学院薬学研究科 薬品動態制御学分野教室一同、並びに分子送達・イメージング技術研究チームをはじめとする理化学研究所 職員の皆様に深謝いたします。

最後に、父 啓一、母 晃子に感謝します。

実験の部

第1章 実験の部

【1】細菌培養

Bacteroides vulgatus (JM 5826^T)、*Blautia coccooides* (JCM 1395^T)、*Bifidobacterium longum* (JCM 1217^T)は Japan Collection of Microorganisms of RIKEN BioResource Research Center (RIKEN BRC) より購入した。変法 GAM 培地 (日水製薬) 中で、嫌気培養キットアネロパック® (三菱ガス化学) を用いて 37 °C、絶対嫌氣的に静置培養した。全ての細菌は増殖静止期まで 16-18 時間前培養したのち 20 倍希釈し、更に 2 時間の培養により対数増殖期に差し掛かった状態で実験に使用した。細菌数は、GAM 寒天培地上に播種したバクテリアの colony forming units (CFUs) に基づいて定量した。

【2】細胞培養

マウス結腸癌細胞株 colon 26 は RIKEN BRC より購入した。10%の非働化したウシ胎児血清、100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシンを添加した RPMI 1640 培地 (ナカライテスク社) 中で 37 °C、5% CO₂、加湿条件下で培養した。

【3】実験動物

BALB/cCrSlc 雄性マウス (7 週齢) は、日本エスエルシー株式会社より購入した。担がんマウスは BALB/cCrSlc マウスの右背部皮下に対し、50 µL の HBSS (ナカライテスク株式会社) に懸濁した colon 26 細胞 3×10^5 個を注入して作製した。約 2 週間後、腫瘍体積が約 100 mm³ になった時点で実験に用いた。全ての動物実験プロトコールは、神戸理化学研究所、動物管理・利用倫理委員会の承認を得たものである。

【4】組織からの細菌単離

担がんマウスもしくは非担がんマウスより腫瘍、肝臓、肺、脾臓、腎臓を摘出し、組織重量に対して 9 倍量の Saline を加えた。氷冷下、ヒストロンハンディホモジナイザー NS-310E (マイクロテック・ニチオン社) を用いて組織をホモジナイズした。得られた組織ホモジネートを、Saline を用いて段階的に希釈し、GAM 寒天培地に播種したのち絶対嫌気条件にて 24-48 時間培養した。

【5】コロニーダイレクト PCR

8 連 PCR 用チューブに組織破碎用ガラスビーズ VK01（エムエス機器株式会社）を 50 μ L dH₂O に混合し、GAM 寒天培地上に形成されたコロニーを一つずつ懸濁した。95°C で 5 分間の加熱処理の後、20 秒間のボルテックスを 2 回行うことで溶菌した。上清に 5 U の制限酵素 *Sma* I（タカラバイオ株式会社）を加え、37°C で一晩インキュベートした。上清を DNA テンプレートとし、KOD One PCR Master Mix（東洋紡社）と Table 1. に記載したプライマーを用いて PCR を行った。得られた PCR 産物を 2%アガロースゲルにアプライし、電気泳動した。ゲルを SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain（Lonza 社）にて染色した後、蛍光イルミネーター TCP-20.LM（ヴィルバー・ルーマツ社）を用いて励起し、撮像した。

【6】組織染色

イソフルランの過吸入により安楽死させたマウスより摘出した腫瘍を氷冷 PBS で洗浄した後、4%パラホルムアルデヒドによって固定した。その後、パラフィン切片（3 μ m）及び凍結切片（3 μ m）を作製し、それぞれグラム染色及びヘマトキシリン&エオシン（H&E）染色したのち顕微鏡観察を行った。なお、グラム陽性菌の検出が目的であったため、フクシンによるグラム陰性菌の染色は行わなかった。

【7】炎症性サイトカインの血中濃度の評価

イソフルランの過吸入により安楽死させたマウス下大静脈より採取した血液を 4°C で一晩静置し、4°C において 10000 g、10 分間の遠心後の上清として血清を得た。血清は、ELISA を行うまで -80°C で保存した。血清中の TNF- α 、IL-6 は ELISA Ready-set go!（eBioscience 社）、IFN- γ 濃度は Mouse IFN γ Uncoated ELISA Kit（ThermoFisher Scientific 社）を用いて定量した。

【8】統計解析

GraphPad Prism 8.0（GraphPad Software 社）を用いて解析を行った。有意差検定は、2 群間の比較には、対応スチューデント *t* 検定あるいは、独立スチューデント *t* 検定を用いた。他群間比較においては、Analysis of variance（ANOVA）を行い、Dunnett's 法または Tukey-Kramer 法により検定した。全 *P* 値は両側であり、*P* < 0.05 を統計学的に有意であるとみなした。

第2章 実験の部

【1】細菌培養

大腸菌コンピテントセル DH5 α 及びプラスミド pZsGreen はタカラバイオ株式会社より購入した。ヒートショック法により形質転換した DH5 α / pZsGreen は Lysogeny Broth (LB) 培地 (10 g/L Bacto Tryptone, 5 g/L Bacto Yeast Extract, 10 g/L NaCl, and 100 μ g/mL carbenicillin) 中で 37°C、130 rpm で好氣的に振盪培養した。*Bacteroides vulgatus* (JM 5826^T)、*Blautia coccoides* (JCM 1395^T)、*Bifidobacterium longum* (JCM 1217^T) はの培養は第1章と同様の方法で行った。また、全ての種類の細菌は第1章と同様の方法で対数増殖期まで培養した後、実験に使用した。

【2】細胞培養

細胞培養は第1章と同様の方法で行った。

【3】実験動物

実験動物は第1章と同様に日本エスエルシー株式会社より購入し、同様に担がんだ。

【4】大腸菌の生物活性測定

Water Soluble Tetrazolium salts (WST) assay を、Microbial Viability Assay Kit-WST (Dojindo 社) のマニュアルに従って行った。各処理を施した大腸菌を LB 培地に再懸濁し、96 well プレートにアプライした。キットに含まれる Electron mediator reagent を添加し、37°C で 15 min もしくは 1 h インキュベートした後、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad 社) を用いて 450 nm における吸光度を測定した。

【5】⁶⁴Cu の製造・精製

⁶⁴Cu は、HM-12S サイクロトロン (住友重機機械工業株式会社) を用いて ⁶⁴Ni を金ディスクに電気メッキしたターゲットに 12 MeV の陽子を照射し、⁶⁴Ni(p,n)⁶⁴Cu 核反応により製造した。照射終了後、ターゲットを 6 N HCl に溶解し、その溶液をイオン交換樹脂 DOWEX 1 \times 8 100-200 mesh (室町ケミカル株式会社) に添加した。その後、1 N HCl で溶出することで ⁶⁴Cu]CuCl₂ を得た。

【6】 バクテリアの ^{64}Cu 標識

対数増殖期のバクテリアを酢酸バッファー (pH 7.0)、Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (PBS)、Hanks' balanced salt solution (HBSS)、Saline 中に懸濁し、6,000 g で2分間の遠心を2度行うことで洗浄した。洗浄後のバクテリアを同一バッファー中に再懸濁し、約 50 MBq の ^{64}Cu CuCl_2 と混合した後、室温で5分間インキュベートした。その後、同一バッファーによる 6,000 g、2分間の遠心洗浄を2度行った。生体内に投与する際には、更なる精製として、37°C の LB 培地中に3分間インキュベート後、遠心する作業を5回繰り返した。標識サンプルの放射活性は、標識開始時刻を基準に減衰補正した。トリプシン処理は、 ^{64}Cu 標識前の大腸菌もしくは Saline による洗浄後の ^{64}Cu 標識大腸菌を、トリプシン (0.5 g/L) 及び 0.53 mM EDTA (ナカライテスク株式会社) と混合し、37°C で5分間インキュベートすることで行った。重金属イオンによる競合阻害実験では CuCl_2 、 AgCl 、 ZnCl_2 、 FeCl_2 、 CaCl_2 及び MgCl_2 を終濃度 1 mM になるように混合した。大腸菌の熱不活化処理では ^{64}Cu 標識前に 75°C もしくは 55°C で15分間のインキュベートを施した。

【7】 血清中での標識安定性評価

Saline もしくは LB 培地による精製を行った ^{64}Cu 標識大腸菌を Saline 中に再懸濁し、等量の血清を加えた (終濃度 50%)。血清は BALB/cCrSlc 雄性マウスより回収した。37°C において15分間のインキュベート後、6,000 g で2分間遠心し上清とペレットの放射活性を 2480 WIZARD² 自動ガンマカウンタ (PerkinElmer 社) を用いて測定した。ペレット画分の回収率は、減衰補正した放射活性を用いて算出した。

【8】 PET 試験

Colon 26 担がんマウスを、1.5%イソフルラン及び亜酸化窒素/酸素 (7/3) により麻酔させ、microPET Focus 220 (Siemens 社) の中央に伏臥位に配置した。 ^{64}Cu 標識大腸菌 (~5 MBq, $\sim 1 \times 10^8$ CFU) もしくは ^{64}Cu 単体をマウス尾静脈に設置したカテーテルより投与し、30分間のダイナミックスキャンを行った。得られたエミッションデータからサイノグラムを作製し、microPET manager 2.4.1.1. (Siemens 社) を用いて画像再構成を行った。放射能は投与時刻に合わせて減衰補正し、ピクセルごとに SUV (standardized uptake value) を用いて表示した。なお、SUV は以下の式に従って算出した。

$$\text{SUV} = [\text{tissue radioactivity concentration (MBq/cm}^3\text{)}] / [\text{injected radioactivity (MBq)/body weight (g)}]$$

【9】TAC 解析

TAC は定量性に優れた Filtered back projection (FBP) 法により画像構成した PET 画像を用いて解析を行った。画像処理ソフトウェア PMOD (PMOD テクノロジー LLC) を用いて心臓、肝臓、肺、脾臓に三次元関心領域 (VOI) を設定し、VOI 内の平均放射能を投与時刻に合わせた減衰補正を行い、SUV として算出した。

【10】摘出臓器の放射能測定

PET 試験後、腫瘍、肺、心臓、肝臓、右腎、脾臓を摘出し、放射能を測定した。投与細菌数依存的な生体内分布の評価では、1.5%イソフルランにより麻酔させたマウスに各細菌数で ^{64}Cu 標識大腸菌を投与した 1 分後、血液、肺、肝臓、脾臓を回収した。各組織の放射活性はガンマカウンタを用いて測定し、投与時刻を基準に減衰補正した。

【11】組織内の大腸菌細菌数測定

担がんマウスに大腸菌を投与後、各タイムポイントで組織を回収し、第 1 章【4】と同様の方法で大腸菌を単離した。ただし、培養には LB 寒天培地を使用し、好氣的に培養した。細菌数は第 1 章【1】と同様に CFUs に基づいて定量した。

【12】ファイバー束型蛍光顕微内視鏡観察

担がんマウスに大腸菌を投与後、3、7、14 日後に観察を行った。マウスを 1.5%イソフルランにより麻酔させ、観察台に伏臥位に配置した。腫瘍を固定し、顕微内視鏡プローブを刺入してイメージングを行った。得られた画像は、画像処理ソフトウェア Image J Fiji を用いて解析した。

【13】定量的 RT-PCR によるプラスミド数の定量

第 1 章【4】に記載の方法で得られた腫瘍ホモジネートを 500g、3 min で 2 回遠心し、細胞分画を大凡取り除いた。上清を 6,000 g で 3 分間遠心し、沈殿として大腸菌を回収した後、含まれる細菌数を第 1 章【1】と同様に CFUs に基づいて定量した。そのうち 5×10^8 CFU の大腸菌を ISOGEN® (ニッポンジーン社) によって溶菌し、エタノール沈殿法によって全 DNA を回収した。含まれる pZsGreen のプラスミド DNA 量は、Fast Start Universal SYBR® Green Master ROX (Roche 社) を利用して、Quant Studio® 5 リアルタイム PCR システム (ThermoFisher Scientific 社) による定量的 PCR により測定した。プライマーは次の配列を用いた。5'-CCGTATGGAAGGGTGCCTCG-3' (forward)、5'-GGCAATGGTCCACCTTCG-3' (reverse)。

【1 4】統計学的解析

GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software 社) 及び IBM SPSS Statistics v. 26 (IBM 社) を用いて解析を行った。有意差検定は、2 群間の比較には、対応スチューデント t 検定あるいは、独立スチューデント t 検定を用いた。他群間比較においては、Analysis of variance (ANOVA) を行い、Dunnett's 法または Bonferroni's 法により検定した。全 P 値は両側であり、 $P < 0.05$ を統計学的に有意であるとみなした。

引用文献

1. Brown, J. M. & Wilson, W. R. Exploiting tumor hypoxia in cancer treatment. *Nat. Rev.* **4**, 437-447 (2004).
2. Forbes, N. S. Engineering the perfect bacterial cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 785–794 (2010).
3. Toso, B. J. F., Gill, V. J., Hwu, P., Marincola, F. M., Restifo, N. P., Schwartzentruber, D. J., Sherry, R. M., Topalian, S. L., Yang, J. C., Stock, F., Freezer, L. J., Morton, K. E., Seipp, C., Haworth, L., Mavroukakis, S., White, D., MacDonald, S., Mao, J., Sznol M. & Rosenberg, S. A. Phase I study of the intravenous administration of attenuated *Salmonella typhimurium* to patients with metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* **20**, 142–152 (2020).
4. Heimann, D. M. & Rosenberg, S. A. Continuous intravenous administration of live genetically modified *Salmonella Typhimurium* in patients with metastatic melanoma. *J. Immunother.* **26**, 179–180 (2003).
5. Ryan, R. M., Green, J., Williams, P. J., Hunt, S., Harmey, J. H., Kehoe, S. C. & Lewis, C. E. Bacterial delivery of a novel cytolysin to hypoxic areas of solid tumors. *Gene. Ther.* **16**, 329–339 (2009).
6. Zheng, J. H., Nguyen, V. H., Jiang, S. N., Park, S. H., Tan, W., Hong, S. H., Shin, M. G., Chung, L. J., Hong, Y., Bom, H. S., Choy, H. E., Lee, S. E., Rhee, J. H. & Min, J. J. Two-step enhanced cancer immunotherapy with engineered *Salmonella typhimurium* secreting heterologous flagellin. *Sci. Transl. Med.* **9**, 1–11 (2017).
7. Pawelek, J. M., Low, K. B. & Bermudes, D. Tumor-targeted *Salmonella* as a novel anticancer vector. *Cancer. Res.* **57**, 4537–4545 (1997).
8. Sasaki, T., Fujimori, M., Hamaji, Y., Hama, Y., Ito, K., Amano, J. & Taniguchi, S., Genetically engineered *Bifidobacterium longum* for tumor-targeting enzyme-prodrug therapy of autochthonous mammary tumors in rats. *Cancer Sci.* **97**, 649–657 (2006).
9. Din, M. O., Danino, T., Prindle, A., Skalak, M., Selimkhanov, J., Allen, K., Julio, E., Atolia, E., Tsimring, L. S., Bhatia, A. N. & Hasty, J. Synchronized cycles of bacterial lysis for in vivo delivery. *Nature* **536**, 81–85 (2016).
10. Mengesha, A., Dubois, L., Labin, P., Landuyt, W., Chiu, R. K., Wouters, B. G. & Theys, J. Development of a flexible and potent hypoxia-inducible promoter for tumor-targeted gene expression in attenuated *Salmonella*. *Cancer. Biol. Ther.* **5** (9), 1120-1128 (2006).
11. Low, K. B., Itensohn, M., Le, T., Platt, J., Sodi, S., Amoss, M., Ash, O., Carmichael, E., Chakraborty, A., Fischer, J., Lin, S. L., Luo, X., Miller, S. I., Zheng, L., King, I., Pawelek, J. M.

- & Bermudes, D. Lipid A mutant *Salmonella* with suppressed virulence and TNF α induction retain tumor-targeting in vivo. *Nat. Biotech.* **17**, 37-41 (1999).
12. Clairmont, C., Lee, K. C., Ittensohn, M., Low, K. B., Pawelek, J., Bermudes, D., Brecher, S. M., Margitich, D., Turnier, J., Li, Z., Luo, X., Ling, I. & Zheng, L. M. Biodistribution and genetic stability of the novel antitumor agent VNP20009, a genetically modified strain of *Salmonella typhimurium*. *J. Infect. Dis.* **181**, 1996–2002 (2000).
 13. Zhao, M., Yang, M., Li, X. M., Jiang, P., Baranov, E., Li, S., Xu, Mingxu, Penman, S. & Hoffman, R. M., Tumor-targeting bacterial therapy with amino acid auxotrophs of GFP-expressing *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 755–760 (2005).
 14. Nuyts, S. Mellaert, L. V., Theys, J., Landuyt, W., Bosmans, E., Anne, J. & Lambin, P. Radio-responsive recA promoter significantly increases TNF α production in recombinant clostridia after 2 Gy irradiation. *Gene Ther.* **8**, 1197–1201 (2001).
 15. Liu, S., Minton, N., Giaccia, A. & Brown, J. Anticancer efficacy of systemically delivered anaerobic bacteria as gene therapy vectors targeting tumor hypoxia/necrosis. *Gene Ther.* **9**, 291–296 (2002).
 16. Jiang, S. N., Phan, T. X., Nam, T. K., Nguyen, V. H., Kim, H. S., Bom, H. S., Choy, H. E., Hong, Y. & Min, J. J. Inhibition of tumor growth and metastasis by a combination of escherichia coli-mediated cytolytic therapy and radiotherapy. *Mol. Ther.* **18**, 635–642 (2010).
 17. Anderson, J. C., Clarke, E. J., Arkin, A. P., Voigt, C. A. & Berkeley, E. O. L. Environmentally controlled invasion of cancer cells by engineered bacteria. *J. Mol. Biol.* **355**, 619–627 (2006).
 18. Woese, C. R., Kandler, O. & Wheelis, M. L. Towards a natural system of organisms : Proposal for the domains archaea, bacteria, and eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**, 4576–4579 (1990).
 19. Kurakawa, T., Ogata, K., Matsuda, K., Tsuji, H. Kubota, H., Takada, T., Kado, Y., Asahara, T., Takahashi, T. & Nomoto, K. Diversity of intestinal *Clostridium coccooides* group in the japanese population , as demonstrated by reverse transcription- quantitative PCR. *PLoS ONE.* **10**(5), e0126226 (2015).
 20. Fujimoto, C. Maeda, H., Kokeguchi, S., Takashiba, S., Nishimura, F., Arai, H., Fukui, K. & Murayama, Y. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to the analysis of microbial communities of subgingival plaque. *J. Periodont Res.* **38**, 440–445 (2003).
 21. Sheu, D., Wang, Y. & Lee, C. Rapid detection of polyhydroxyalkanoate- accumulating bacteria isolated from the environment by colony PCR. *Microbiology* **146**, 2019–2025 (2000).
 22. Kimura, T., Aoki, K. & Baba, T. Selective localization and growth of *Bifidobacterium bifidum* in mouse tumors following intravenous administration. *Cancer Res.* **40**, 2061–2068 (1980).

23. Kocijancic, D., Felgner, S., Frahm, M., Komoll, R. M., Iljazovic, A., Pawar, V., Rohde, M., Heise, U., Zimmermann, K., Gunzer, F., Hammer, J., Crull, K., Lescher, S. & Weiss, S. Therapy of solid tumors using probiotic Symbioflor-2-restraints and potential. *Oncotarget* **7**, 22605–22622 (2016).
24. Yazawa, K., Fujimori, M., Nakamura, T., Sasaki, T., Amano, J., Kano, Y. & Taniguchi, S. Bifidobacterium longum as a delivery system for gene therapy of chemically induced rat mammary tumors. *Breast Cancer Res. Treat.* **66**, 165–170 (2001).
25. Taniguchi, S., Fujimori, M., Sasaki, T., Tsutsui, H., Shimatani, Y., Seki, K. & Amano, J. Targeting solid tumors with non-pathogenic obligate anaerobic bacteria. *Cancer Sci.* **101**, 1925–1932 (2010).
26. Chu, W., Hung, L., Hou, C. & Chen, J. BBA - Gene Regulatory Mechanisms Heterogeneous ribonucleoprotein F regulates YAP expression via a G-tract in. *BBA - Gene Regul. Mech.* **1862**, 12–24 (2019).
27. Oldenburg, K. R., Vo, K. T., Michaelis, S. & Paddon, C. Recombination-mediated PCR-directed plasmid construction in vivo in yeast. *Nucl. Acids Res.* **25**, 451–452 (1997).
28. Zhao, D., Yuan, S., Xiong, B., Sun, H., Ye, L., Li, J., Zhang, X. & Bi, C. Development of a fast and easy method for *Escherichia coli* genome editing with CRISPR/Cas9. *Microb. Cell Fact.* **15**(1), 1–9 (2016).
29. Lin, W. & Johnson, E. A. Genome analysis of *Clostridium botulinum* Type A by pulsed-field gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 4441–4447 (1995).
30. Hielm, S., Bjorkroth, J., Hyytia, E. & Korkeala, H. Genomic analysis of *Clostridium botulinum* Group II by Pulsed-Field Gel Genomic Analysis of *Clostridium botulinum* Group II by pulsed-field gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 703–708 (1998).
31. Wang, R., Cao, W. & Cerniglia, C. E. PCR detection and quantitation of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1242–1247 (1996).
32. Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., Kado, Y., Takada, T., Matsumoto, K. & Tanaka, R. Quantitative PCR with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers for analysis of human intestinal Bifidobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 167–173 (2004).
33. Wang, R. F., Kim, S., Robertson, L. H. & Cerniglia, C. E. Development of a membrane-array method for the detection of human intestinal bacteria in fecal samples. *Mol. Cell. Probes.* **16**, 341–350 (2002).
34. Traverso, F. R., Bohr, U. R. M., Oyarzabal, O. A., Rohde, M., Clarici, A., Wex, T., Kuester, D., Malfertheiner, P., Fox, J. G. & Backert, S. Morphologic, genetic, and biochemical characterization of *Helicobacter Magdeburgensis*, a novel species isolated from the intestine of laboratory mice. *Helicobacter* **15**, 403–415 (2010).
35. Round, J. L. & Mazmanian, S. K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **9**(5), 313–324 (2009).

36. Ichinohe, T., Pang, I. K., Kumamoto, Y., Peaper, D. R., Ho, J. H., Murray, T. S. & Iwasaki, A. Microbiota regulates immune defense against respiratory tract in influenza A virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **108**(13), 5354-5359 (2011).
37. Lim, D., Kim, K. S., Kim, H., Ko, K. C., Song, J. J., Choi, J. H., Shin, N., Min, J. J., Joeng, J. H. & Choy, H. E. Anti-tumor activity of an immunotoxin (TGF α -PE38) delivered by attenuated *Salmonella typhimurium*. *Oncotarget* **8**(23), 37550-37560 (2017).
38. Nakamura, T., Sasaki, T., Fujimori, M., Yazawa, K., Kano, Y., Amano, J. & Taniguchi, S. Cloned cytosine deaminase gene expression of *Bifidobacterium longum* and application to enzyme/pro-drug therapy of hypoxic solid tumors. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**, 2362–2366 (2014).
39. Felgner, S., Kocijancic, D., Frahm, M., Heise, U., Rohde, M., Zimmermann, K., Falk, C., Erhardt, M. & Weiss, S. Engineered *Salmonella enterica serovar Typhimurium* overcomes limitations of anti-bacterial immunity in bacteria-mediated tumor therapy. *Oncoimmunology* **7**, 1–12 (2018).
40. Chen, J., Qiao, Y., Tang, B., Chen, G., Liu, X., Yang, B., Wei, J., Zhang, X., Cheng, X., Du, P., Jiang, W., Hu, Q. & Hua, Z. C. Modulation of *Salmonella* tumor-colonization and intratumoral anti-angiogenesis by triptolide and its mechanism. *Theranostics* **7**, 2250–2260 (2017).
41. Coutermarsh-ott, S. L., Broadway, K. M., Scharf, B. E. & Allen, I. C. Effect of *Salmonella enterica serovar Typhimurium* VNP20009 and VNP20009 with restored chemotaxis on 4T1 mouse mammary carcinoma progression. *Oncotarget* **8**(20), 33601–33613 (2017).
42. Cronin, M., Morrissey, D., Rajendran, S., Mashad, S. M. E., Sinderen, D., Sullivan, G. C. & Tangney, M. Orally administered bifidobacteria as vehicles for delivery of agents to systemic tumors. *Mol. Ther.* **18**, 1397–1407 (2010).
43. Nham, T., Filali, S., Danne, C., Derbise, A. & Carniel, E. Imaging of bubonic plague dynamics by *in vivo* tracking of bioluminescent *Yersinia pestis*. *PLoS ONE*. **7**(4), e34714 (2012).
44. Zhou, J., Bi, Y., Xu, X., Qiu, Y., Wang, Q., Feng, N., Cui, Y., Yan, Y., Zhou, L., Tan, Y., Yang, H., Du, Z., Han, Y., Song, Y., Zhang, P., Zhou, D., Cheng, Y., Zhou, Y., Yang, R. & Wang, X. Bioluminescent tracking of colonization and clearance dynamics of plasmid-deficient *Yersinia pestis* strains in a mouse model of septicemic plague. *Microbes Infect.* **16**, 214–224 (2014).
45. Bergstöm, M., Grahnen, A. & Langstrom, B. Positron emission tomography microdosing : a new concept with application in tracer and early clinical drug development. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **59**, 357–366 (2003).
46. Mukai, H., Ozaki, D., Cui, Y., Kuboyama, T., Yamato-Nagata, H., Onoe, K., Takahashi, M., Wada, Y., Imanishi, T., Kodama, T., Obika, S., Suzuki, M., Doi, H. & Watanabe, Y. Quantitative evaluation of the improvement in the pharmacokinetics of a nucleic acid drug delivery system by dynamic PET imaging with F-incorporated oligodeoxynucleotides. *J. Control. Release* **180**, 92–99 (2014).

47. Sugiyama, Y. & Yamashita, S. Impact of microdosing clinical study — Why necessary and how useful? *Adv. Drug Deliv. Rev.* **63**, 494–502 (2011).
48. Guan, J., Zhu, Z., Zhao, R. C., Xiao, Z., Wu, C., Han, Q., Chen, L., Tong, W., Zhang, J., Han, Q., Gao, J., Feng, M., Bao, X., Dai, J. & Wang, R. Biomaterials transplantation of human mesenchymal stem cells loaded on collagen scaffolds for the treatment of traumatic brain injury in rats. *Biomaterials* **34**, 5937–5946 (2013).
49. Gupta, R. & Mohapatra, H. Microbial biomass : An economical alternative for removal of heavy metals from waste water. *Indian. J. Exp. Biol.* **41**, 945–966 (2003).
50. Hansda, A. & Kumar, V. Biosorption of copper by bacterial adsorbents : A Review. *Res. J. Environ. Toxicol.* **9**(2), 45-58 (2015).
51. Villapún, V. M., Dover, L. G., Cross, A. & González, S. Antibacterial metallic touch surfaces. *Materials*. **736**, (2016).
52. Uchugonova, A., Zhao, M., Zhang, Y., Weinigel, M., König, K. & Hoffman, R. M. Cancer-cell killing by engineered *Salmonella* imaged by multiphoton tomography in live mice. *Anticancer Res.* **32**, 4331–4338 (2012).
53. Funabiki, K. In vivo visualization of neural circuits located in the deep brain area with a micro-endoscope. *Equilibrium Res.* **70**(2), 110-114 (2011).
54. Yashiro, H., Nakahara, I., Funabiki, K. & Riquimaroux, H. Micro-endoscopic system for functional assessment of neural circuits in deep brain regions : Simultaneous optical and electrical recordings of auditory responses in mouse's inferior colliculus. *Neurosci. Res.* **119**, 61–69 (2017).
55. Savvaidis, I., Hughes, M. N., Poole, R. K. & Tn, S. S. Copper biosorption by *Pseudomonas cepacia* and other strains. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 117–121 (2003).
56. Zheng, Y., Fang, X., Ye, Z., Li, Y. & Cai, W. Biosorption of Cu(II) on extracellular polymers from *Bacillus sp. F19*. *J. Environ. Sci.* **20**, 1288–1293 (2008).
57. Vecchietti, D., Silvestre, D. D., Miriani, M., Bonomi, F., Marengo, M., Bragonzi, A., Cova, L., Franceschi, E., Mauri, P. & Bertoni, G. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* cell envelope proteome by capture of surface-exposed proteins on activated magnetic nanoparticles. *PLoS ONE*. **7**(11), e51062 (2012).
58. Donnenberg, V. S., Corselli, M., Normolle, D. P., Meyer, E. M. & Donnenberg, A. D. Flow cytometric detection of most proteins in the cell surface proteome is unaffected by trypsin treatment. *Cytometry Part A* **93A**, 803-810 (2018).
59. Gonzales-siles, L., Karlsson, R., Kenny, D., Karlsson, A. & Sjöling, Å. Proteomic analysis of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in neutral and alkaline conditions. *BMC Microbiol.* 1–17 (2017).
60. Dias, A. V & Zamble, D. B. Protease digestion analysis of *Escherichia coli* NikR : evidence for conformational stabilization with Ni(II). *J. Biol. Inorg. Chem.* **10**, 605–612 (2005).

61. Mary, A. N. N., Achyuthan, E., Greenberg, S. & Carolina, N. The binding of divalent metal ions to Platelet Factor XIII modulates its proteolysis by trypsin and thrombin. *Arch. Biochem. Biophys.* **261**(1), 112–121 (1988).
62. Nakajima, A. Electron spin resonance study of copper biosorption by bacteria. *Water Res.* **36**, 2091–2097 (2002).
63. Air, W., Philip, L. & Iyengar, L. Site of interaction of copper on *Bacillus Polymyxa*. *Water, Air and Soil Pollution.* **119**, 11–21 (2000).
64. Wang, F. *et al.* Contribution of cell-surface components to Cu²⁺ adsorption by *Pseudomonas putida* 5-x. *Appl. Biochem. Biotech.* **128**, 33–46 (2006).
65. Ginisty, P., Besnainou, B., Sahut, C. & Guezennec, J. Biosorption of cobalt by *Pseudomonas halodenitrificans*: influence of cell wall treatment by alkali and alkaline-earth metals and ion-exchange mechanisms. *Biotechnol. Lett.* **20**(11), 1035–1039 (1998).
66. Mullen, M. D., Wolf, D. C., Ferris, F. G., Beveridge, T. J., Flemming, C. A. & Bailey, G. W. Bacterial sorption of heavy metals. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 3143–3149 (1989).
67. Cooksey, D. A. Copper uptake and resistance in bacteria. *Mol. Microbiol.* **7**(1), 1–5 (1993).
68. Dozois, C. M. Iron, copper, zinc, and manganese transport and regulation in pathogenic Enterobacteria: correlations between strains, site of infection and the relative importance of the different metal transport systems for virulence. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **3**, 1–24 (2013).
69. Brader, P., Stritzker, J., Riedi, C., Zanzonico, P., Cai, S., Burnazi, E. M., Ghani, E. R., Hricak, H., Szalay, A. A., Fong, Y., & Blasberg, R. *Escherichia coli* Nissle 1917 facilitates tumor detection by positron emission tomography and optical imaging. *Clin. Cancer Res.* **14**, 2295–2302 (2008).
70. Soghomonyan, S. A., Doubrovin, M., Pike, J., Luo, X., Ittensohn, M., Runyan, J. D., Balatoni, J., Finn, R., Tjuvajev, J. G., Blasberg, R. & Bermudes, D. Positron emission tomography (PET) imaging of tumor-localized Salmonella expressing HSV1-TK. *Cancer Gene Ther.* **12**, 101–108 (2005).
71. Li, J., Zheng, H., Fodah, R., Warawa, J. M. & Ng, C. K. Validation of 2-¹⁸F-fluorodeoxysorbitol as a potential radiopharmaceutical for imaging bacterial infection in the lung. *J. Nucl. Med.* **59**, 134–139 (2018).
72. Weinstein, E. A., Ordonez, A. A., DeMarco, V. P., Murawski, A. M., Pokkali, S., MacDonald, E. M., Klunk, M., Mease, R. C., Pomper, M. G. & Jain, S. K. Imaging enterobacteriaceae infection in vivo with ¹⁸F-fluorodeoxysorbitol positron emission tomography. *Sci. Transl. Med.* **6**, 259ra146 (2014).
73. Ojeda, S. S., Wang, Z. J., Mares, C. A., Chang, T. A., Li, Q., Morris, E. G., Jerabek, P. A. & Teale, M. Rapid dissemination of *Francisella tularensis* and the effect of route of infection. *BMC Microbiol.* **8**, 1–15 (2008).

74. Nham, T., Filali, S., Danne, C., Derbise, A. & Carniel, E. Imaging of bubonic plague dynamics by *in vivo* tracking of bioluminescent *Yersinia pestis*. *PLoS ONE*. **7**(4), e34714 (2012).
75. Barbash, I. M., Chouraqui, P., Baron, J., Feinberg, M. S., Etzion, S., Tessone, A., Miller, L., Guetta, E., Zipori, D., Kedes, L. H., Kloner, A. & Leor, J. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium. *Circulation* **103**, 863–868 (2003).
76. Rudokas, M., Najlah, M., Alhnan, M. & Elhissi, A. Liposome delivery systems for inhalation: a critical review highlighting formulation issues and anticancer applications. *Med. Princ. Pract.* **25**(2), 60-72 (2016).
77. Mook, O.R.F., Marle, J.V., Vreeling-Sindelarova, H., Jonges, R., Frederiks, W.M., Noorden, C.J.F.V., Visualization of early events in tumor formulation of eGFP-transfected rat colon cancer cells in liver. *Hepatology* **38**, 295-304. (2003).
78. Dang, L. H., Bettogowda, C., Huso, D. L., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. Combination bacteriolytic therapy for the treatment of experimental tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**(26), 15155-15160. (2001).
79. Felgner, S., Pawar, V., Kocijancic, D., Erhardt, M. & Weiss, S. Tumour-targeting bacteria-based cancer therapies for increased specificity and improved outcome. *Microbiol Biotech.* **10**, 1074-1078 (2017).
80. Sznol, M., Lin, S. L., Bermudes, D., Zheng, L. & King, I. Use of preferentially replicating bacteria for the treatment of cancer. *J. Clin. Invest.* **105**, 1027–1030 (2000).
81. Westphal, K., Leschner, S., Jablonska, J., Loessner, H. & Weiss, S. Containment of tumor-colonizing bacteria by host neutrophils. *Cancer. Res.* **68**(8), 2952–2961 (2008).
82. Yu, Y. A., Shabahang, S., Timiryasova, T. M., Zhang, Q., Beltz, R., Gentshev, I., Goebel, W. & Szalay, A. A. Visualization of tumors and metastases in live animals with bacteria and vaccinia virus encoding light-emitting proteins. *Nat. Biotech.* **22**, 313-320. (2004).
83. Umehara, S. & Yasuda, K. Hysteresis of energy consumption of motility and growth in *Escherichia coli*. *J. HTSJ.* **43**(180), 28-33. (2004).