

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10894

研究課題名(和文) 角膜感染症に対する光線力学的抗微生物化学療法(PACT)の開発と臨床応用

研究課題名(英文) Clinical application of photodynamic antimicrobial chemotherapy for infectious keratitis

研究代表者

近間 泰一郎(Chikama, Taiichiro)

広島大学・医歯薬保健学研究科(医)・准教授

研究者番号：00263765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、光線力学的抗微生物化学療法(photodynamic antimicrobial chemotherapy: PACT)による新規角膜感染症治療法の確立が究極の目的である。in vitroの研究として、糸状真菌に対するPACTの効果は、フサリウムに有効であったが、アスペルギルスには効果が低く、菌種による違いがあった。アカントアメーバに対するPACTが、栄養体に対して非常に有効であることも確認できた。シストに対しても抑制効果が確認できた。白色家兔角膜感染症モデルによるin vivoでのPACTの有効性の検討を行った。黄色ブドウ球菌感染眼に対するPACTの有効性が確認できた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to establish a new treatment with photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) for infectious keratitis.

In this period, we evaluated we evaluated the effectiveness of photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) with TONS504 on filamentous fungi and Acanthamoeba. TONS504-PACT inhibited the growth of *Fusarium solani*. However, there was no inhibitory effect for *Aspergillus fumigatus* by TONS504-PACT. TONS504-PACT suppressed the viability of *Acanthamoeba* through apoptosis and necrosis in vitro.

We have started to evaluate the in vivo effectiveness of TONS504-PACT. PACT with TONS504 attenuated the development of corneal infection with *S. aureus* in a rabbit model in vivo, with repeated application of PACT improving its efficacy.

研究分野：眼科学

キーワード：光線力学療法 角膜感染症 抗病原微生物 薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

本来、健全な角膜に対してのコンタクトレンズ使用やレーシック術後などにも生じる角膜感染症は、失明に至ることのある重篤な疾患であると同時に治療に費やす医療費や労働力損失も看過できない。実地臨床では、角膜感染症の起炎病原体は多岐にわたり、診断・治療に苦慮することも多い。さらに、近年、各種感染症治療において薬剤耐性病原体出現という大きな問題を抱えており、その対応は喫緊の課題である。

光線力学的療法 (photodynamic therapy: PDT) は、光感受性物質が癌細胞などの異常細胞や新生血管にのみ集まることを利用して、集積した光感受性物質にレーザー光などをあてることにより局所的な活性酸素種の産生により癌細胞や新生血管を破壊、退縮させることができる。種々の癌治療や眼科領域においては加齢黄斑変性の治療に臨床応用されている。一方で、病原微生物に対する PDT の研究は、細菌 (Biel MA. Methods Mol Biol. 2010, Hamblin M. Photochem. Photobiol. Sci. 2004)、ウイルス (Moore C. et al. Infect. Immunity 1972)、アカントアメーバ (Chen Z. et al. Br J Ophthalmol 2010) など *in vitro* における殺菌作用の報告はあるものの、いまだに臨床応用されていない。現在、我々が研究している光線力学的微生物化学療法

(photodynamic antimicrobial chemotherapy: PACT) では、病原微生物に対して広く殺菌効果が期待できる新しく合成された光感受性物質であるポルフィリン誘導体 TONS504 (特開 2009-263317) と研究用に新たにデザインされた 660nm の波長を有する LED を光源とする光照射装置を用いて、角膜感染症の起炎病原体に対して有効性を検討している。平成 23 年度に研究成果展開事業研究成果最適展開支援プログラムフェージビリティスタディ【FS】ステージ探索タイプ (採択課題番号 AS232Z01652F) に採択されて以降、グラム陽性菌 (黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌、アクネ菌)、グラム陰性菌 (緑膿菌、セラチア菌、大腸菌)、真菌 (カンジダ)、ウイルス (単純ヘルペスウイルス-1) に対して以下の *in vitro* での初期検討を行った。

2. 研究の目的

究極の目的は、光線力学的抗微生物化学療法 (photodynamic antimicrobial chemotherapy: PACT) による抗病原微生物薬に頼らない新しい角膜感染症治療法の確立である。臨床応用の実現により、視機能維持、治療期間の短縮、医療費の削減にも寄与することが期待できる。

3. 研究の方法

in vitro

1. TONS504 の角膜感染症起炎病原体に

対する殺菌効果の条件を検討する。TONS504 濃度および光照射量を変化させ、各種病原体の殺菌に最も効果的な条件を探る。

1) 各種病原体を基本 1×10^7 CFU に調整した状態で TONS504 の濃度を変えて 0-100mg/L の暴露下で LED (660nm : TONS504 の最大吸収波長) $10\text{J}-30\text{J}/\text{cm}^2$ 照射し、菌液を採取し、希釈した後に標準寒天培地上に播種して 37℃、24 時間 (菌種により異なる) でコロニーをカウントし殺菌効果を確認する。

2. *in vitro* での正常角膜細胞に対する TONS504 および光線照射の影響を検討する。

1) 培養ヒト角膜上皮細胞、培養ヒト角膜実質細胞をチャンバースライドに培養し、TONS504 の濃度を 0-100mg/L の曝露下で LED (660nm : TONS504 の最大吸収波長) 10J ($165\text{mW}/\text{cm}^2$, 60 秒) 照射し、30 分後に上清を除いたのち、トリパンブルーなどを用いて生細胞数をカウントする。

2) LED の照射条件を 0-30J と変えて同様に生細胞数を確認する。

in vivo

1) 白色家兎角膜感染眼モデルを用いた光線力学的抗微生物化学療法 (PACT) の有効性の検討

白色家兎角膜に 23G 針を用いて創を作成後、各種病原体を播種し感染症眼を作成する。各種病原体に対する適切と思われる濃度の TONS504 を点眼および LED 照射を行い、PACT 施行眼と非施行眼を経時的に観察し、臨床的有效性を培養検査および生化学的検討により確認する。

2) 角膜の形態学的および組織学的検討
過麻酔による安楽死後に角膜を摘出し、組織切片にて炎症細胞の浸潤や組織構造の変化について免疫組織学的検討を行う。

3) 他の眼組織への影響の確認
摘出眼球を用いて TONS504 および LED 照射による網膜などへの影響を組織学的に検討する。

4. 研究成果

これまで明らかにした角膜感染症起炎病原体に対する *in vitro* での殺菌条件の検討

1) 黄色ブドウ球菌 (MSSA) とメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) に対する効果
MRSA に対しては TONS504 $1.0\text{mg}/\text{L}$ LED 照射 $20\text{J}/\text{cm}^2$ で殺菌効果が得られ、薬剤耐性菌に対しての有効性が確認できた。

(Latief MA, Chikama T (CA) et al. Lasers in Med. Sci. 30:383-387, 2015)

2) 他の病原微生物の殺菌に必要な最小 TONS 濃度と LED 照射条件の検討

LED 照射後 24 時間後では、TONS504 の濃度依存的に PACT の有効性が確認された。

グラム陰性細菌と真菌では、グラム陽性細菌と比較し高濃度の TONS504 が必要で

あった。また、0.05M-EDTA の添加により PACT の効果が発揮されることを世界で初めて明らかにした (特願 2013-037671)。この結果は、過去の報告と比べて低容量の薬剤と低出力のレーザーにより達成され、臨床応用における安全性に関して期待をもたせる結果である。

3) 抗ヘルペスウイルス (HSV-1) 効果の検討

HSV-1 とアシクロビル耐性 HSV-1 (2 種類) に対しても同条件 (TONS 濃度 1.0mg/L, LED 照射条件 20 J/cm²) で有効性を示した。MRSA と同様、薬剤耐性株に対しての有効性が確認された。(Latief MA, Chikama T (CA) et al: Mol Vis. 21:532-7, 2015)

4) 培養ヒト角膜実質細胞および HSV-1 の宿主細胞である FL 細胞に対する影響 LDH 活性測定による細胞傷害性の評価では、今回検討の条件下において培養ヒト角膜実質細胞と FL 細胞への有意な細胞傷害性はみられなかった。

5) PACT の緑膿菌に対する経時的抗微生物効果 LED 照射直後 ~ 1 時間後までは抗微生物効果はみられなかったが、3 ~ 9 時間後に強い抗微生物効果を認め、照射 3 時間後に最も強かった。LED 照射 3 時間後に LED を追加照射することにより、細菌増殖はより強く抑制された。今回の検討で PACT 後の抗微生物効果の出現には一定の時間を要することが判明し、原核生物にもみられるアポトーシス機構 (toxin-antitoxin system) が関与している可能性が考えられた。(Sueoka K, Chikama T (CA) et al. Lasers Med Sci. 2018)

6) 糸状菌に対する効果

角膜感染症の原因となる糸状菌 *F. solani* に対しては PACT で抗微生物効果が確認された。一方、*A. fumigatus* に対しては、PACT および EDTA 添加 PACT いずれも抗微生物効果は限定的であり、細胞壁構造の違いなどが影響している可能性が考えられた。しかしながら、抗微生物効果を評価できなかった糸状菌において、孢子液を抽出することで効果判定が可能となった。

7) 家兎黄色ブドウ球菌角膜感染モデルに対する in vivo PACT 効果

日本白色雄性家兎を用い、片眼に角膜損傷黄色ブドウ球菌 (ATCC 25923) 感染モデルを作製した。PACT は、TONS504 1mg/ml と LED 照射 30 J/cm² で行った。菌接種 6・9 時間後の PACT 計 2 回施行の PACT2 回群、菌接種 6・12・24 時間後の PACT 計 3 回施行の PACT3 回群、コントロールとして無治療群、TONS504 単独群、LED 単独群を設定し菌接種 6 日後までの 7 日間、前眼部所見を観察してスコアリングした。無治療群、TONS 単独群、LED 単独群では菌接種 24 時間後から感染所見が出現しはじめ、48 時間後には高度の角膜感染症に至った。PACT3 回群は観察期間中に感染所見は

生じなかったが、角膜浮腫により角膜透過性が軽度低下した。複数回の PACT を施行することでの感染制御ができ、角膜感染症に対する TONS 504-PACT の有効性を示すことができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Sueoka K, Chikama T (CA), Latief MA, Ko JA, Kiuchi Y, Sakaguchi T, Obana A: Time-dependent antimicrobial effect of photodynamic therapy with TONS 504 on *Pseudomonas aeruginosa*. *Lasers Med Sci.* (published online 27 March 2018) 査読有
2. Latief MA, Chikama T (CA), Shibasaki M, Sasaki T, Ko JA, Kiuchi Y, Sakaguchi T, Obana A: Antimicrobial action from a novel porphyrin derivative in photodynamic antimicrobial chemotherapy in vitro. *Lasers Med Sci.* 30:383-7, 2015 査読有
3. Latief MA, Chikama T (CA), Ko JA, Kiuchi Y, Sakaguchi T, Obana A: Inactivation of acyclovir-sensitive and -resistant strains of herpes simplex virus type 1 in vitro by photodynamic antimicrobial chemotherapy. *Mol Vis.* 21:532-7, 2015 査読有
4. 近間泰一郎: 角膜感染症に対する PACT の臨床応用の確立に向けて. *光アラ イアンス.* 26: 5-8, 2015 査読無

[学会発表] (計 11 件)

1. Pertiwi YD, 近間泰一郎, 末岡健太郎, 高知愛, 木内良明, 坂口剛正: Efficacy of Photodynamic Antimicrobial Therapy with TONS504 on *Acanthamoeba*. 角膜カンファランス 2018 (広島: 2018 年 2 月 15-17 日)
2. 末岡健太郎, 近間泰一郎, 高知愛, 木内良明, 坂口剛正, 尾花明, 阪田功, 市川晶: 緑膿菌に対する光線力学的抗微生物化学療法の経時的効果. 第 27 回日本光線力学学会学術講演会 (京都: 2017 年 7 月 14-15 日)
3. Chikama T, Sueoka K, Ko JA, Kiuchi Y, Sakaguchi T, Obana A: Antimicrobial efficacy of photodynamic therapy with TONS504 against pathogenic filamentous fungi. ARVO 2017 (米国ボルチモア: 2017 年 5 月 7 日-11 日)
4. 末岡健太郎, 近間泰一郎, 高知愛, 木内良明, 坂口剛正: 家兎黄色ブドウ球菌角膜感染モデルに対する光線力学的抗微生物化学療法の効果. 第 121 回日本眼科学会総会 (東京: 2017 年 4 月

- 6-9日)
5. 近間泰一郎, 末岡健太郎, 高知愛, 坂口剛正, 木内良明: 糸状真菌に対する光線力学的抗微生物化学療法の効果. 角膜カンファランス 2017(福岡: 2017年2月16-18日)
 6. 末岡健太郎, 近間泰一郎, 高知愛, 坂口剛正, 木内良明: 緑膿菌に対する光線力学的抗微生物化学療法を経時的効果. 第20回眼創傷治癒研究会(福岡: 2016年8月20-21日)
 7. 近間泰一郎, 末岡健太郎, 高知愛, 坂口剛正, 木内良明: 糸状真菌に対する光線力学的抗微生物化学療法の効果. 第20回眼創傷治癒研究会(福岡: 2016年8月20-21日)
 8. 末岡健太郎, 近間泰一郎, Latief MA, 高知愛, 木内良明: 緑膿菌に対する光線力学的抗微生物化学療法を経時的効果. 第53回日本眼感染症学会(東京: 2016年7月1-3日)
 9. 近間泰一郎: 感染症に対する光線力学的抗微生物化学療法. 第120回日本眼科学会総会(仙台: 2016年4月7-10日) シンポジウム
 10. 末岡健太郎, 近間泰一郎, Latief MA, 高知愛, 木内良明: TONS 504 を用いた光線力学的抗微生物化学療法の光照射環境に関する検討. 第120回日本眼科学会総会(仙台: 2016年4月7-10日)
 11. 近間泰一郎: TONS504 を用いた光線力学療法(PDT)の in vitro における抗菌および抗ウイルス効果 一角膜感染症に対する新規治療法の開発を目指して. 第25回日本光線力学学会学術講演会(東京: 2015年7月11日) シンポジウム2

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近間 泰一郎 (CHIKAMA, Taiichiro)

広島大学・医歯薬保健学研究科(医)・准教授

研究者番号: 00263765

(2) 研究分担者

高 知愛 (KO, Ji-Ae)

広島大学・医歯薬保健学研究科(医)・准教授

研究者番号: 70314797