

令和元年6月18日現在

機関番号：32717

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01423

研究課題名(和文) LED白色光を用いた新規殺菌法の開発

研究課題名(英文) Development of highly efficient antimicrobial therapy by white LED light.

研究代表者

徳岡 由一 (Tokuoka, Yoshikazu)

桐蔭横浜大学・医用工学部・教授

研究者番号：30339907

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、白色LED光を照射することによって黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)が死滅する現象(光線力学的不活化、PDI)のメカニズムを解明し、より効果的な殺菌細胞法の構築を目的に検討を行った。その結果、パルス光によってPDI効果は高くなることを見出した。さらに、PDI効果に白色LED光照射に伴い産生される活性酸素種が関与し、*S. aureus*が産生するカロテノイド系色素がPDI効果に影響していることが明らかとなった。すなわち、カロテノイド系化合物は白色LED光照射により活性酸素種を産生すると予想していたが、実際には抗酸化作用を発現し、PDI効果に対して抑制的に作用することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は新規抗菌薬の開発が見込まれない現代医療において、新たな感染症治療法の可能性を生む重要な研究内容である。これまで、細菌に対する光線力学的不活化は耐性菌が生まれにくいともされており、さらに種々の波長を含む白色LED光による光線力学的不活化効果のメカニズムが明らかとなれば、他の菌種への応用の可能性もある。また、光線力学的不活化が臨床応用できれば、院内感染に対して常に注意しながら行う医療において、平均在院日数の短縮や医療経済への効果も期待できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Antimicrobial resistance, which is resistance of a microorganism to antibiotics, has been global concern. We had found out the photodynamic inactivation (PDI) of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) by white LED light irradiation. In this study, we then investigated the mechanism of PDI of *S. aureus* by white LED light irradiation in order to develop highly efficient antimicrobial therapy. As a result, we found that PDI was greater by the pulsed irradiation of white LED light than by the continuous irradiation. Moreover, it was revealed that PDI was caused by reactive oxygen species generated by photochemical reaction and that the carotenoid pigment produced by *S. aureus* was related to PDI. That is to say, the carotenoid pigment acted as an antioxidant, but not as a photosensitizer for PDI, inhibiting PDI of *S. aureus*.

研究分野：医用工学システム

キーワード：光線力学的不活化 白色LED光 黄色ブドウ球菌 Staphyloxanthin

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

医療関連感染は医療経済を圧迫する要因の一つで、医療機関はその制御が義務づけられている。しかし、薬剤耐性菌に対する医療関連感染制御においては、効果が期待される抗菌薬の種類が少なかったり、使用した抗菌薬が新たに耐性菌を選択したりするなどの悪循環となるため、新規抗菌薬の開発は進んでいないのが現状である。そこで、抗菌薬を用いない新たな感染症治療法が求められている。抗菌薬を用いない新たな感染症治療法が確立されれば、抗菌薬による耐性菌選択のリスク低減に繋がり、効率的な感染制御をもたらすことが期待される。

我々は予備的実験結果として *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) の標準菌株に対する光増感物質を用いない光治療 (Phototherapy) において、*S. aureus* に白色 LED 光を 30 分間照射することで、培地上の菌数が有意に減少し、その効果は光照射エネルギーの増加に伴い増加することを見出した (図 1)。

光線力学的療法 (Photodynamic therapy、PDT) は光増感物質 (または、その前駆物質) を細胞に取り込ませて集積させ、特定の波長の可視光線により光励起し、そのエネルギーを基に生成する活性酸素種による殺細胞能力を活用した治療法である。我々はこれまで、尋常性疥癬患者に対する 5-アミノレブリン酸 (ALA) による PDT が臨床的に有効で、菌数を減少させることを明らかにしてきた (Kimura M., Tokuoka Y., 2004)。一方、光増感物質を用いず、光照射のみによって細菌の発育を直接抑止する効果として、光線力学的不活化 (Photodynamic inactivation、PDI) が知られている。Maclean M.ら (2009) は、405nm の狭域スペクトル LED 光線はグラム陰性菌と比べて *S. aureus* などのグラム陽性菌に対して高い PDI 効果を発揮することを報告した。しかし、細菌に対して光増感物質を外部から取り込ませない PDI の殺細胞効果に関する機序については解明が進んでいない。そこで我々は、*S. aureus* が産生するカロテノイド系化合物である Staphyloxanthin に着目した。

カロテノイド系化合物は、微生物や植物によって生合成される化合物で、光合成生物ではアンテナ色素として光エネルギー捕集や光障害防御などの生理的役割を担っている。さらに、抗酸化作用をもつ物質としても有名である。一方、吉井らは培養癌細胞に対する PDT において、カロテノイド系化合物が光増感物質として有用であることを見出した。しかし、抗酸化性を有するカロテノイドの存在下で、どのように活性酸素種が作用したかについての詳細な検討は行われていない。そこで、我々が見出した細菌殺細胞もこの機序に近いと考え、細菌細胞自身が産生する内在性光増感物質を利用した PDI 効果機序の解明を目的に、研究に着手するに至った。尚、細菌に対する抗菌薬を用いない新たな殺菌法は新規性が極めて高いといえる。

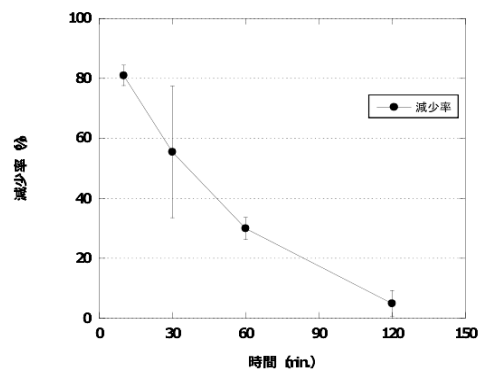


図 1 *S. aureus* に対する白色 LED の経時的殺菌効果

## 2. 研究の目的

臨床応用を視野に入れ、細菌細胞に対する PDI に関する基礎研究として、広域スペクトルである白色 LED 光を用いた光照射による細菌殺細胞機序を解明することを目的に、以下の 4 点に着目して研究を進めた。

- (1) 細菌殺細胞効果機序の解明
- (2) 効果的な光照射方法の検討および LED 照射装置の改良
- (3) *S. aureus* が産生するカロテノイド系化合物と PDI 効果との相関の解明
- (4) *S. aureus* における光増感物質の探索

## 3. 研究の方法

### (1) PDI 効果の比較と効果要因の推定

菌株は、標準菌株 *S. aureus* ATCC29213、*S. aureus* N315、*S. aureus* N315 $\Delta$ sigB、*S. aureus* 8325-4 および *S. aureus* SH1000 (8325-4 の rsbU の修復株) を用いた。白色 LED 光源装置は太陽光発電評価用光源 (照射強度 25.2 mW $\cdot$ cm<sup>-2</sup>、図 2) を用いた。研究期間中、装置は VBA にてパルス照射の On/Off を制御できるように改良した。PDI 効果は照射エネルギー量を一定とし、①連続光照射-パルス光照射間、②照射時の培地の違いおよび③色素産生株-非産生株間について比較した。被検菌株を供試培地に塗抹した。光照射は暗所にて白色 LED 光のみが培地全体に照射されるよう調節した。コントロールは光照射しないまま暗所に同時間放置した。光照射後、好気培養にて発育したコロニー数を算定し、光照射培地に発育したコロニー数をコントロールのそれで除して生存率とした。尚、生存

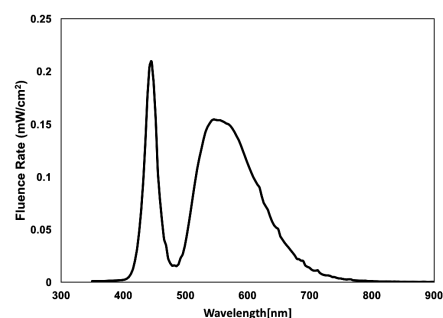


図 2 白色 LED 光源のスペクトル

率が低いほど、PDI 効果は高い。

## (2) 光増感性物質の推定と色素抽出

被検菌株を 150 mL の Brain Heart Infusion Broth に接種し、37°C、130rpm で一晩振盪培養した。遠心集菌後、10mL エタノールに浮遊させ、超音波洗浄機にて 40°C、20 分間超音波を照射し、細菌成分をエタノール抽出した。得られた抽出物は、高速液体クロマトグラフィ (HPLC) にて分析した。カラムは ODS カラム、溶離液にはエタノールを用い、流速は 1mL/min、カラム温度は 40°C で測定した。検出器には紫外・可視分光検出器 (UV-VIS) および蛍光検出器 (FL) を用い、UV-VIS での検出は 460nm の吸光度を、FL では励起光 460nm による 522nm の蛍光ピーク強度を検出した。

## 4. 研究成果

### (1) PDI 効果の比較と効果変動要因の推定

連続白色 LED 光を照射した場合、生存率は照射エネルギーに伴って指数関数的に低下した (図 3 中●)。すなわち、照射エネルギーの増加に伴って PDI 効果は増加することがわかった。さらに、On/Off=1sec/1sec のパルス光照射において、45J・cm<sup>2</sup> 以上の照射エネルギーの際に、PDI 効果は有意に増加した (図 3○)。このことより、細菌に対する PDI 効果増加の一要因として、パルス光が有効であることがわかった。これは、光未照射時に酸素が供給されることによって、活性酸素種の産生がより増強されるためと考えられている。

また、PDI 時において光照射の際の培地を変えると PDI 効果は大きく変動した (図 4)。すなわち、普通寒天培地 (NA)、トリプチケースソイ寒天培地 (TSA) および LB 寒天培地 (LBA) では高い PDI 効果が認められた。一方、チョコレート寒天培地 (CHO)、ヒツジ血液寒天培地 (BA) および GAM 寒天培地 (GAM) 上で白色 LED 光照射をしても、ほとんど PDI 効果は認められなかった。培地中の成分組成を確認してみると、チョコレート寒天培地および血液寒天培地にはポルフィリンが、GAM 寒天培地には L-システインやチオグリコール酸などの還元剤が含まれており、これらが活性酸素種に対する消去剤として働いたためと推察される。

これら一連の研究結果から、細菌細胞に対する PDI 効果には、活性酸素種の関与が示唆された。

次に、色素産生と PDI 効果との相関について検討した。色素産生株/非産生株による PDI 効果の違いは顕著に現れた。その結果を図 5 に示す。N315ΔsigB および 8325-4 株がそれぞれ色素非産生株であるが、いずれにおいても PDI 効果が高かった。逆に、色素産生株である N315 および SH1000 の PDI 効果は低かった。この結果から、*S. aureus* が産生する着色色素である Staphyloxanthin は、従来の報告どおり、抗酸化物質として作用することが示唆された。すなわち、光照射によって産生された活性酸素種が抗酸化作用を有する Staphyloxanthin によって消去されるため、色素産生株において PDI 効果が低下したと考えられる。また、図 5 から明らかなように、着色の有無にかかわらず、いずれの菌株においても PDI 効果が認められた。このことから、*S. aureus* に対する PDI 効果における光増感性物質は、多くの株で恒常的に産生される代謝産物である可能性が示唆された。

### (2) 光増感性物質の推定と色素抽出

図 6 にエタノール抽出した細菌細胞成分の HPLC クロマトグラムを示す。UV-VIS (図 6A) のクロマトグラム中、いずれの細菌細胞においても保持時間約 3 分にピークが認められた。上述の通り、いずれの菌株においても PDI 効果が認められたことを考慮すると、すべてのクロマトグラムに共通して認められたこのピークを示す化合物が PDI 効果に寄与していると推察される。さらに、FL (図 6B) のクロマトグラムにも同保持時間にピークが認められたことから、この化合物は光増感作用を示す可能性がある。以上の結果から、保持時間約 3 分に現れるピークを示す化合物が、白色 LED 光照射に伴う *S. aureus* の PDI 効果に寄与していることが示唆された。一方、UV-VIS (図 6A) のクロマトグラムにおいて、色素産生株のみ保持時間 3 分以降

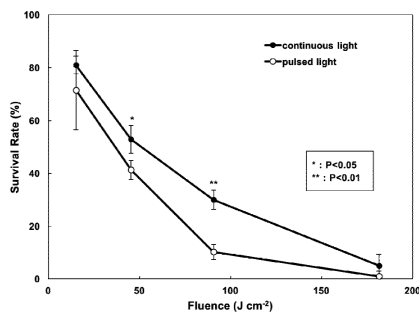


図 3 連続光とパルス光照射の比較

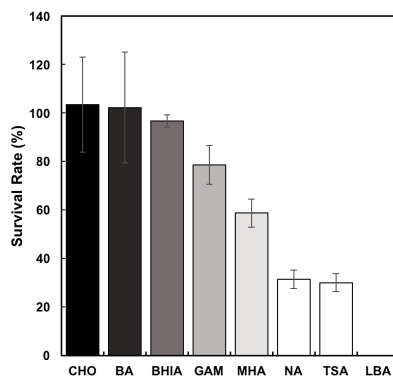


図 4 照射時の培地の違いによる比較

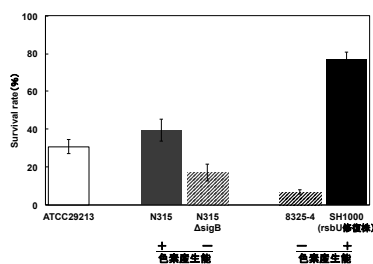


図 5 色素着色の違いによる比較

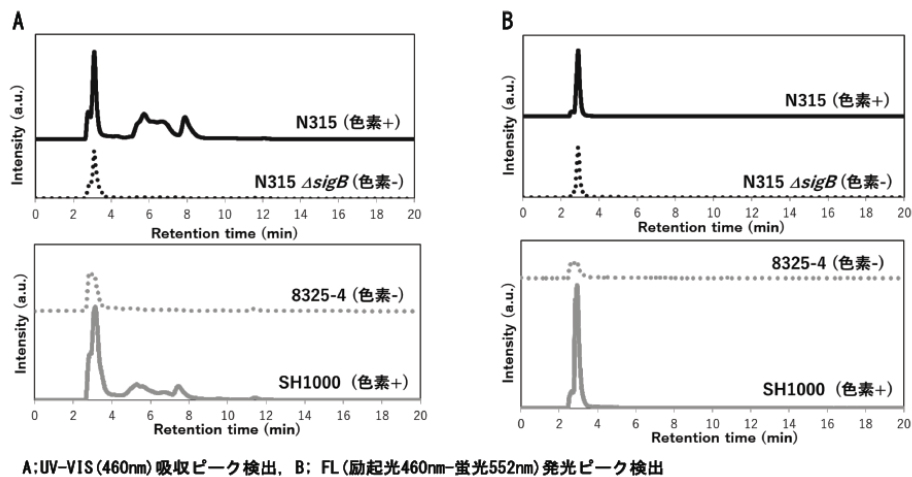


図6 エタノール抽出細菌細胞成分の HPLC クロマトグラム

にピークが認められたことから、これらのピークは *S. aureus* 産生色素に由来するピークであると考えられる。

これら一連の研究成果は、白色 LED を用いた *S. aureus* に対する PDI に関する基礎研究として、発育抑制機序を明らかにするための有益な情報となる。今後は、細菌細胞内の光増感性物質を同定すると共に、より効率的な光照射条件等を検討し、白色 LED 光を用いた新たな感染症治療法の構築を目指したい。

## 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 16 件)

- ① 大城真奈, 蓮沼裕也, 齋藤潔, Study on photoinactivation of *Staphylococcus aureus*, 日本化学会第 99 春季年会 2019 (2019).
- ② 金沢浩平, 蓮沼裕也, 高橋篤史, 大城真奈, 齋藤潔, 角田拓也, 池上和志, 徳岡由一, 白色 LED 光照射による *Staphylococcus aureus* の発育抑制に対するカロテノイド系化合物の影響, 第 29 回日本臨床微生物学会総会 (2018).
- ③ 高橋篤史, 蓮沼裕也, 金沢浩平, 大城真奈, 齋藤潔, 池上和志, 徳岡由一, *Staphylococcus aureus* に対する白色 LED 光照射による発育抑制が分裂時間に与える影響, 第 29 回日本臨床微生物学会総会 (2018).
- ④ 高橋篤史, 蓮沼裕也, 池上和志, 徳岡由一, 白色 LED 光照射による *Staphylococcus aureus* の発育誘導期に及ぼす影響, 第 91 回日本細菌学会総会 (2018).
- ⑤ 大城真奈, 西村知泰, 萩 春風, 齋藤 潔, 蓮沼裕也, *Staphylococcus aureus* の光による発育抑制現象に関する研究, 第 91 回日本細菌学会総会 (2018).
- ⑥ Atsushi Takahashi, Yuya Hasunuma, Masashi Ikegami, Yoshikazu Tokuoka, Influence of White LED Light Irradiation on *Staphylococcus aureus* Cellular Structure, 13th Toin International Symposium on Biomedical Engineering 2018 (2018).
- ⑦ Mana Oshiro, Yuya Hasunuma, Kiyoshi Saito, Study on photoinactivation of *Staphylococcus aureus*, 13th Toin International Symposium on Biomedical Engineering 2018 (2018).
- ⑧ 佐藤麻美, 蓮沼裕也, 徳岡由一, 培地の違いによる *Staphylococcus aureus* のカロテノイド系化合物抽出色素の比較, 第 13 回日本臨床検査学教育学会学術大会 (2018).
- ⑨ 大城真奈, 蓮沼裕也, 齋藤潔, *Staphylococcus aureus* の光発育抑制現象に関する研究, 第 8 回 CSJ 化学フェスタ 2018 (2018).
- ⑩ 高橋篤史, 蓮沼裕也, 池上和志, 徳岡由一, *Staphylococcus aureus* の細胞構造に及ぼす白色 LED 光照射の影響, 第 28 回日本光線力学学会学術集会 (2018).
- ⑪ 金沢浩平, 蓮沼裕也, 高橋篤史, 大城真奈, 齋藤潔, 池上和志, 徳岡由一, *Staphylococcus aureus* に対する白色 LED を用いた発育抑制効果機序の検討, 第 28 回日本臨床微生物学会総会・学術集会 (2017).
- ⑫ 金沢浩平, 蓮沼裕也, 大城真奈, 高橋篤史, 齋藤潔, 池上和志, 徳岡由一, 白色 LED による *Staphylococcus aureus* の発育抑制効果機序, 第 27 回日本光線力学学会学術集会 (2017).
- ⑬ 大城真奈, 西村知泰, 萩 春風, 齋藤 潔, 蓮沼裕也, *Staphylococcus aureus* が産生するカロテノイド色素と光細菌殺細胞効果現象との関係, 第 7 回 CSJ 化学フェスタ 2017 (2017).
- ⑭ Kohei Kanazawa, Yuya Hasunuma, Masashi Ikegami, Yoshikazu Tokuoka, Pulsed light doses for photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* using white LED devices, 12th Toin International Symposium on Biomedical Engineering 2017 (2017).

- ⑮ Atsushi Takahashi, Yuya Hasunuma, Masashi Ikegami, Yoshikazu Tokuoka, Influence of white LED light irradiation on doubling time of *Staphylococcus aureus*, 12th Toin International Symposium on Biomedical Engineering 2017 (2017).
- ⑯ Kohei Kanazawa, Yuya Hasunuma, Masashi Ikegami, Yoshikazu Tokuoka, Study of phototherapy for *Staphylococcus aureus* using white LED devices, Toin International Symposium on Biomedical Engineering 2016 (2016).

[その他]

ホームページ

<http://www.cc.toin.ac.jp/sc/hasunuma/>

<http://www.cc.toin.ac.jp/sc/miyasaka/>

<http://ccmg.cc.toin.ac.jp/univ/gakujutsu/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：蓮沼 裕也

ローマ字氏名：HASUNUMA, Yuya

所属研究機関名：桐蔭横浜大学

部局名：医用工学部生命医工学科

職名：助教

研究者番号 (8 桁)：70643013

研究分担者氏名：池上 和志

ローマ字氏名：IKEGAMI, Masashi

所属研究機関名：桐蔭横浜大学

部局名：医用工学部臨床工学科

職名：准教授

研究者番号 (8 桁)：30375414

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：齋藤 潔

ローマ字氏名：SAITO, Kiyoshi

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。