

令和 3 年 5 月 8 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09411

研究課題名(和文)角膜感染症に対する光線力学的化学療法(PACT)の臨床応用

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・医系科学研究科(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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、光感受性物質(TONS504)と光照射装置を用いた光線力学的抗微生物化学療法(photodynamic antimicrobial chemotherapy: PACT)による新しい角膜感染症に対する臨床応用が究極の目的である。

本研究期間内に日本白色ウサギを用いてアカントアメーバ角膜炎モデルを確立し、TONS504-PACTにより50%以上で有効な治療効果を示すことができた。同時に、組織学的検討により角膜内皮および網膜への有害な影響がないことも確認された。総合的な成果として、TONS504-PACTについての必要な有効性、安全性のデータが着実に収集され、臨床応用に着実に近づいている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

病原微生物の種類を問わず殺病原体効果が期待できる抗微生物化学療法(PACT)を用いた新しい角膜感染症治療法の臨床応用の実現をめざす研究である。

この治療法が確立すれば、薬剤耐性病原微生物による角膜感染症にも早期から対処でき、視機能維持に大きく貢献することになる。また、抗微生物薬の使用を減らすことで新たな薬剤耐性(AMR)病原微生物の出現抑制につながることも期待できる。さらに、視機能低下や長期にわたる治療により生じる労働力の損失の軽減にも寄与すると考えている。

研究成果の概要(英文)：The ultimate goal of this study is the clinical application of our photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) using a photosensitizer (TONS504) and a light irradiator for infectious keratitis.

During this study period, we established a model of Acanthamoeba keratitis using Japanese white rabbits. Then, our TONS504-PACT achieved excellent therapeutic effects over 50% cases. At the same time, histological examination confirmed no adverse impact on the corneal endothelium and retina. As comprehensive results, the efficacy and safety data for TONS504-PACT have been steadily collected and are steadily approaching clinical application.

研究分野：角結膜疾患、眼感染症、遺伝性眼疾患

キーワード：光線力学療法 角膜感染症 薬剤耐性 抗病原微生物

## 1. 研究開始当初の背景

本来健常である角膜に対してのコンタクトレンズ使用やレーシックなどの屈折矯正手術後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の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、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cantアムーバ (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。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 *in vitro* での初期検討を行った。角膜感染症の治療法として、我々が行っている PDT の実地臨床における有効性と実用性についての検討を、感染動物モデルを用いた *in vivo* 研究により確認し臨床応用に向けての準備を進めたいと考えていた。

## 2. 研究の目的

本研究は、新規光感受性物質である水溶性カチオン性クロリン誘導体の TONS504 と 660nm の単波長 LED 光照射装置を用いた光線力学的抗微生物化学療法 (photodynamic antimicrobial chemotherapy: PACT) による新しい角膜感染症治療法の確立が究極の目的である。臨床応用が実現することで視機能維持、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と確信している。

## 3. 研究の方法

### *in vitro*

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  $1 \times 10^7$  CFU に調整した状態で TONS504 の濃度を変えて暴露し 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。

#### in vivo

白色家兎角膜に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する。

1) 臨床の有効性を病理組織学的、生化学的検討により確認する。

角膜の形態学および組織学的検討を組織切片にて炎症細胞の浸潤や組織構造の変化により行う。

2) 安全性の確認

摘出眼球を用いて TONS504 および LED 照射による角膜内皮や網膜などへの影響を組織学的に検討する。

#### 4. 研究成果

本研究期間において以下のことを明らかにした。

in vitro 研究では、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が確認できた。また、あらゆる治療に抵抗性を示すシストに対しても抑制効果が確認できた。また、これまで PACT 分野で複数の報告があるメチレンブルーとわれわれが用いている TONS504 の PACT 効果の違いについて in vitro で検討した。抗微生物効果は、モル濃度換算で TONS504 がメチレンブルーに対して、黄色ブドウ球菌では約 100 倍、酵母型真菌であるカンジダでは約 10 倍、緑膿菌ではほぼ同等の有効性を示した。であることが明らかとなった。引き続き、摘出眼球を用いて TONS504 および LED 照射による本治療の副作用としての角膜実質細胞や内皮細胞さらに網膜などへの影響を組織学的に検討する。同時に、LED 照射装置とレパルスレーザー照射装置の効果の比較とパルス照射の有用性についての検討を予定している。

in vivo の研究においては、TONS504-PACT により感染を治癒せしめた角膜においても好中球を中心とした炎症細胞の浸潤が強い例も多く、黄色ブドウ球菌感染モデルにおいてステロイドの結膜下注射併用の PACT では炎症軽減はほとんど有効性が見られなかった。

また、日本白色雄性家兎を用いてアカントアメーバ角膜炎感染モデルを作製できた。現時点では、1 回施行の PACT において 50% 以上の有効性が示すことができた。アカントアメーバ角膜炎感染モデルに対しては、今後、治療効率の向上を目指して複数回の PACT を施行しその効果判定を行う予定である。

さらに、TONS504-PACT の安全性について角膜内皮および網膜の形態学的変化、アポトーシス検出を目的とした免疫組織学的検討を行なった。角膜内皮および網膜においてはともに形態学的変化はなく、アポトーシス陽性細胞は TONS504-PACT 群において網膜内に僅かに見られたが有意な変化ではなく、安全性が確認された。

#### 受賞ならびにシンポジウム発表

1) 角膜カンファランス 2021 (松山、Web 開催、2021/2/11-2/13) 眞鍋賞受賞 (最優秀ポスター賞) 宍道紘一郎、近間泰一郎、末岡健太郎、Pertiwi YD、坂口剛正、木内良明、尾花明：光感受性物質 TONS504 とメチレンブルーの光線力学的抗微生物効果の比較

2) 角膜カンファランス 2020 (東京、2020/2/27-2/29) 内田賞受賞 (感染・炎症部門の最優秀ポスター賞) Pertiwi YD、近間泰一郎、末岡健太郎、高 知愛、木内良明、小野寺一、坂口剛正: In vivo effectiveness of TONS504-PACT on Acanthamoeba Keratitis.

3) 第 29 回日本光線力学学会 (東京、2019/9/19-9/20) シンポジウム Pertiwi YD、近間泰一郎、末岡健太郎、高 知愛、木内良明、小野寺一、坂口剛正: TONS504 mediated photodynamic antimicrobial chemotherapy for the treatment of Acanthamoeba keratitis in vivo.

4) ISER2018 (Belfast, North Ireland, UK 2018/9/9-9/13) Chikama T, Pertiwi Y.D, Sueoka K, Ko JA, Kiuchi Y, Onodera M, Sakaguchi T: In Vitro Effectiveness of Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy with TONS504 for Eradication of Acanthamoeba.

5) 角膜カンファランス 2018 (広島、2018/2/15 -2/17) シンポジウム 末岡健太郎: 角膜感染症に対する光線力学的抗微生物化学療法 ( PACT )

論文リスト ( \*: corresponding author)

1) Sueoka K, Chikama T\*, 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* 33: 1455-1460, 2018

2) Sueoka K, Chikama T\*, Pertiwi YD, Ko JA, Kiuchi Y, Sakaguchi T, Obana A: Antifungal efficacy of photodynamic therapy with TONS 504 for pathogenic filamentous fungi. *Lasers Med Sci* 34: 743-747, 2019

3) Pertiwi YD, Chikama T\*, Sueoka K, Ko JA, Kiuchi Y, Onodera M, Sakaguchi T: Antimicrobial Photodynamic Therapy with the photosensitizer TONS504 eradicates *Acanthamoeba*. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 28: 166-171, 2019

4) Pertiwi YD, Chikama T\*, Sueoka K, Ko JA, Kiuchi Y, Onodera M, Sakaguchi T: Efficacy of photodynamic antimicrobial chemotherapy on *Acanthamoeba keratitis* in vivo. *Lasers Surg. Med.* 28: 166-171, 2020

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sueoka K, Chikama T, Pertiwi YD, Ko JA, Kiuchi Y, Sakaguchi T, Obana A	4. 巻 34
2. 論文標題 Antifungal efficacy of photodynamic therapy with TONS 504 for pathogenic filamentous fungi	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Lasers Med Sci	6. 最初と最後の頁 743-747
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10103-018-2654-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Pertiwi YD, Chikama T, Sueoka K, Ko JA, Kiuchi Y, Onodera M, Sakaguchi T	4. 巻 28
2. 論文標題 Antimicrobial Photodynamic Therapy with the photosensitizer TONS504 eradicates Acanthamoeba	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Photodiagnosis Photodyn Ther	6. 最初と最後の頁 166-171
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pdpdt.2019.08.035	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Sueoka K, Chikama T, Latief MA, Ko JA, Kiuchi Y, Sakaguchi T, Obana A.	4. 巻 33
2. 論文標題 Time-dependent antimicrobial effect of photodynamic therapy with TONS 504 on Pseudomonas aeruginosa.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Lasers in Medical Science	6. 最初と最後の頁 1455-1460
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10103-018-2490-0.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Dwia Pertiwi Yuniathy, Chikama Taiichiro, Sueoka Kentaro, Ko Ji Ae, Kiuchi Yoshiaki, Onodera Makoto, Sakaguchi Takemasa	4. 巻 28
2. 論文標題 Efficacy of Photodynamic Anti Microbial Chemotherapy for Acanthamoeba Keratitis In Vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Lasers in Surgery and Medicine	6. 最初と最後の頁 166 - 171
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/lsm.23355	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Pertiwi YD、近間泰一郎、末岡健太郎、高 知愛、木内良明、小野寺 一、坂口剛正
2. 発表標題 In vivo effectiveness TONS504-PACT on Acanthamoeba Keratitis
3. 学会等名 角膜カンファランス2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宍道紘一郎、近間泰一郎、末岡健太郎、Pertiwi YD、坂口剛正、木内良明、尾花 明
2. 発表標題 光感受性物質TONS504とメチレンブルーのS. aureusに対する光線力学的抗微生物効果の比較
3. 学会等名 第29回日本光線力学学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Pertiwi YD、近間泰一郎、末岡健太郎、高 知愛、木内良明、小野寺一、坂口剛正
2. 発表標題 TONS504 mediated photodynamic antimicrobial chemotherapy for the treatment of Acanthamoeba keratitis in vivo
3. 学会等名 第29回日本光線力学学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Pertiwi YD, Chikama T, Sueoka K, Ko JA, Kiuchi Y
2. 発表標題 TONS504 mediated photodynamic antimicrobial chemotherapy inactivation for Acanthamoeba keratitis in rabbits in vivo.
3. 学会等名 ARVO 2019 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 末岡健太郎、近間泰一郎、高 知愛、坂口剛正、木内良明
2. 発表標題 家兔角膜感染モデルに対する光線力学的抗微生物化学療法 of 臨床的および組織学的検討
3. 学会等名 第122回日本眼科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Chikama T, Sueoka K, Ko JA, Sakaguchi T, Kiuchi Y
2. 発表標題 Clinical and Histopathologic Evaluation of the Efficacy of Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy for Experimental Keratitis
3. 学会等名 ARVO-2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Pertiwi YD, Chikama T, Sueoka K, Ko JA, Kiuchi Y
2. 発表標題 In Vitro Effectiveness of Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy with TONS504 for Eradication of Acanthamoeba.
3. 学会等名 ARVO-2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Chikama T, Pertiwi Y.D, Sueoka K., Ko JA, Kiuchi Y, Onodera M, Sakaguchi T
2. 発表標題 In vitro Effectiveness of Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy with TONS504 for Eradication of Acanthamoeba
3. 学会等名 ISER 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宍道紘一郎、末岡健太郎、近間泰一郎、高 知愛、坂口剛正、木内良明
2. 発表標題 糸状真菌に対する光線力学的抗微生物化学療法の効果
3. 学会等名 LASER WEEK IN TOKYO
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 ベルティウイ ユニアルティデウイア、近間泰一郎、末岡健太郎、高 知愛、木内良明、小野寺 一、坂口剛正
2. 発表標題 Efficacy of Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy with TONS504 on Acanthamoeba eradication
3. 学会等名 LASER WEEK IN TOKYO
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宍道紘一郎、近間泰一郎、末岡健太郎、Pertiwi YD、坂口剛正、木内良明、尾花 明
2. 発表標題 TONS504とメチレンブルーのS.aureusとP.aeruginosaに対する光線力学的抗微生物効果の比較
3. 学会等名 LASER WEEK IN KOCHI
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宍道紘一郎、近間泰一郎、末岡健太郎、Pertiwi YD、坂口剛正、木内良明、尾花 明
2. 発表標題 光感受性物質TONS504とメチレンブルーの光線力学的抗微生物効果の比較
3. 学会等名 角膜カンファランス2021
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	高 知愛  (Ko Ji-ae)  (70314797)	広島大学・医系科学研究科(医)・准教授   (15401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------