

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592692

研究課題名(和文) 光線力学療法を応用した培養細胞からの新規マイコプラズマ除去方法の開発

研究課題名(英文) Development of a method to remove mycoplasmas from the contaminated cell cultures using antimicrobial photodynamic therapy

研究代表者

長谷部 晃 (HASEBE, Akira)

北海道大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：90281815

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：微生物の培養細胞への混入、とりわけマイコプラズマの混入はしばしば大きな問題となるが、その除去のための抗菌薬の使用は耐性菌の誘導などの問題がある。したがって抗菌薬によらない除菌方法の開発が必要である。

我々は、腫瘍の治療などに利用される光線力学療法を応用し、培養細胞を傷害することなく細胞に混入したマイコプラズマを除去できることを示した。この研究により、培養細胞に影響を与える事なく混入した微生物を除去する新たな道筋が示された。

研究成果の概要(英文)：Mycoplasmas are one of the most frequent contaminants due to their characteristics in cell cultures. It is required to develop a method to remove mycoplasmas without using antibiotics, because a treatment with antibiotics may induce antibiotic-resistant bacteria. This study attempted to remove cell culture-contaminating *Mycoplasma salivarium* (Ms) by utilizing antimicrobial photodynamic therapy with a cordless red light emitting diode. Ms-infected human embryonic kidney 293 cells was irradiated with red light emitting diode in the presence of methylene blue as a photosensitizer, after decreasing the number of live Ms by washing with sterilized phosphate-buffered saline. No MS was detected in the contaminated cells by both mycoplasma detection kit and cultivation after antimicrobial photodynamic therapy, demonstrating that antimicrobial photodynamic therapy successfully remove Ms from its contaminated cells without giving damages to the cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：光線力学療法 マイコプラズマ汚染 培養細胞

1. 研究開始当初の背景

生命科学における培養細胞の重要性はますます高まってきており、基礎研究においてのみならず、様々なレベルでの培養細胞の実践的利用が進んでいる。

例えば、最近、ワクチン製造においても培養細胞の利用が進められており、例えばインフルエンザウィルスに対するワクチンにおいても、それを迅速に大量生産するために、従来の鶏卵を用いる方法ではなく培養細胞を用いる方法が開発されつつある。また、クラミジアのワクチン製造においても培養細胞を利用することが研究されている。再生医療の領域では、歯根膜細胞由来細胞をヒトから分離培養し、その細胞を歯周組織の再生に利用できると報告された (Cell Tissue Res, 341: 397-404, 2010)。また、2010年には歯肉から万能細胞である iPS 細胞を効率良く作製できることが報告され、それを顎骨の再生医療に役立てることが検討されている (PLoS ONE, 5: e12743, 2010)。このように培養細胞は基礎研究のみならず非常に多くの技術に応用されることが期待される。

培養細胞の利用において、微生物による汚染は大きな問題である。微生物に汚染された細胞の使用は、研究に多大な損害ならびに予期せぬ危険をもたらすので絶対に避けなければならない。基本的に、培養細胞の微生物による汚染の予防あるいは除去には、培地への抗真菌薬ならびに細胞壁合成阻害剤などの抗菌薬の添加などで対処することが知られている。しかしながら、マイコプラズマはこれらの方法では除去できない。なぜならマイコプラズマは細胞壁を欠くので、細胞壁合成阻害剤が無効だからである。また、マイコプラズマは自己増殖可能な最小の微生物であり、培養細胞を汚染しても培地の混濁がないため、目視により確認することが出来ず、汚染の発見が遅れやすい。

マイコプラズマはヒトに常在するものもあることから、しばしば培養細胞はマイコプラズマに汚染される。マイコプラズマ汚染の除去ならびに感染の治療では、マクロライドなどの抗菌薬が使用されてきた。しかしながら、抗菌薬の使用は耐性菌の発生と表裏の関係にあり、実際に、肺炎マイコプラズマにおいてもマクロライド耐性株についての報告も増えている。したがって、耐性菌の誘導をさけるために抗菌薬に依存しないマイコプラズマの除去方法の開発が必須である。

我々はその方法として光線力学療法 (photodynamic therapy, PDT) に注目した。光線力学療法は、腫瘍細胞に色素などの光感受性物質を取り込ませたり、付着させたりし、レーザー光などの照射により光感受性物質を励起させ、産生された活性酸素が腫瘍細胞を障害することを利用して腫瘍を治療する方法である。これを微生物の除去に応用したのが anti-microbial photodynamic therapy (aPDT) であり、抗菌薬の場合と異なり耐

性菌出現がないことから注目されている。具体的には、微生物に光感受性物質を付着させ、そこに光照射を行うことで微生物を殺滅するという方法である。我々は、aPDT を利用して培養細胞からマイコプラズマを除去する方法を開発しようと考えた。

2. 研究の目的

我々は、抗菌薬を使用せず aPDT を利用して培養細胞からマイコプラズマを除去し、さらに、細胞内侵入性マイコプラズマならびに様々な細胞株においても有効な方法を検索し、出来るだけ普遍的な除菌方法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

口腔常在の *Mycoplasma salivarium* を種々の培養細胞に混入し、aPDT による除菌効果を確認した。光感受性物質はメチレンブルー (MB) を使用し、光照射は、高エネルギーである赤色光の照射が可能となるように改造された歯科用 LED 照射器を使用した。具体的には図 1A の照射器を用いて、*M. salivarium* 培養液の容器底面あるいは *M. salivarium* の混入した培養細胞のシャーレ底面から照射した (図 1B)。また本照射器の照射光エネルギーを図 1C に示す。

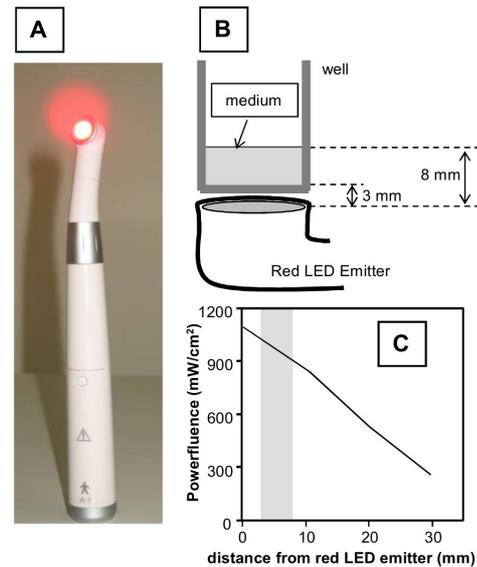


図 1. LED 照射について. A: 本研究で用いられた光照射器. B: 照射方法. C: 照射の距離 (横軸) とエネルギー (縦軸) の関係.

M. salivarium に対する殺菌効果の確認は、マイコプラズマの検出キットである MycoAlert (Lonza 社) と培養法で行った。また、*M. hominis* のリポタンパク質の抽出は n-octyl-β-glucopyranoside により行い、その生物活性は単球・マクロファージ系細胞 THP-1 ならびに RAW264.7 を刺激し得られた培養上清中のサイトカインを ELISA 法で調べた。

4. 研究成果

まず、MB が HEK293 細胞の増殖及ぼす影響を調べた。すると、細胞の密度に関係なく MB の濃度が 100 ng/ml 以下で、光の照射時間が 60 秒以下では影響が小さいことがわかった (図 2)。

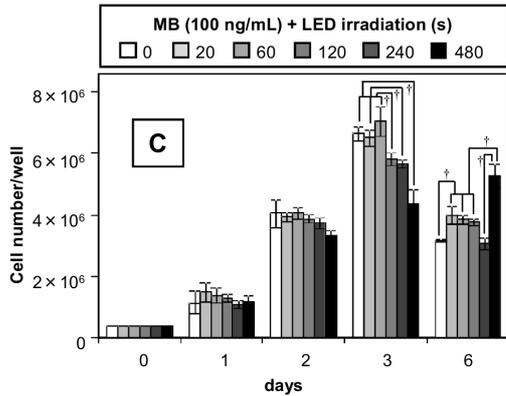


図 2. MB 100 ng/ml 存在下における光照射時間の変化が HEK293 細胞の増殖に及ぼす影響。縦軸：HEK293 生細胞数、横軸：照射後日数。

また、同様な光照射時間における HEK293 細胞へのアポトーシスの誘導をフローサイトメーターで調べたところ、照射時間依存的にアポトーシスを起こす細胞が増加するが、照射時間 60 秒まではアポトーシスを起こす細胞が少ないことが確認された (図 3)。

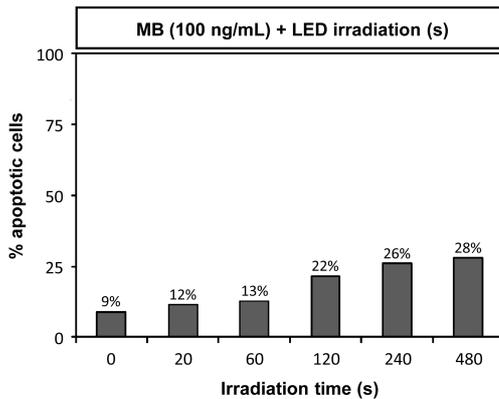


図 3. MB 100 ng/ml 存在下における光照射時間の変化による HEK293 細胞へのアポトーシス誘導について。横軸：照射時間、縦軸：アポトーシスを起こした HEK293 細胞の割合。

そこで、MB 100 ng/ml 存在下における *M. salivarium* に対する aPDT の影響を調べた。その結果種々の密度の *M. salivarium* に対して、光照射時間依存的に *M. salivarium* が殺菌され、*M. salivarium* も 60 秒の光照射でほぼ死滅することがわかった (図 4)。

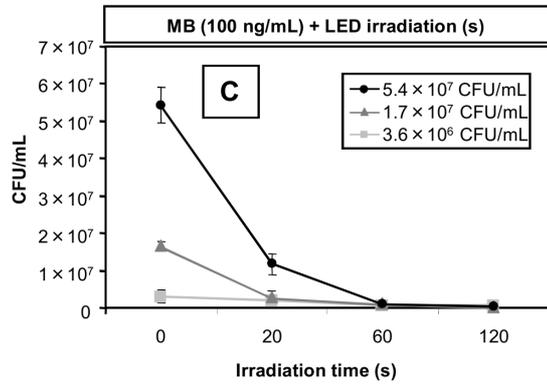


図 4. MB 100 ng/ml 存在下における種々の密度の *M. salivarium* に対する光照射の影響。縦軸：生 *M. salivarium* 数、横軸：照射時間。

これらの結果から、*M. salivarium* の混入した HEK293 細胞において、HEK293 細胞に影響を与えずに *M. salivarium* を除去することが試みられたが、aPDT 処理後 3 日で *M. salivarium* が検出されたことから、混入している *M. salivarium* の数が多すぎることが予想された。そこで次に *M. salivarium* の混入した HEK293 細胞を滅菌したリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 3 回洗う事で、物理的に *M. salivarium* の数を減少させてから aPDT を施してみた。その結果、細胞の aPDT 処理後 60 日を経過しても、MycoAlert による検出でも培養法でも *M. salivarium* が検出されないことがわかった (図 5)。

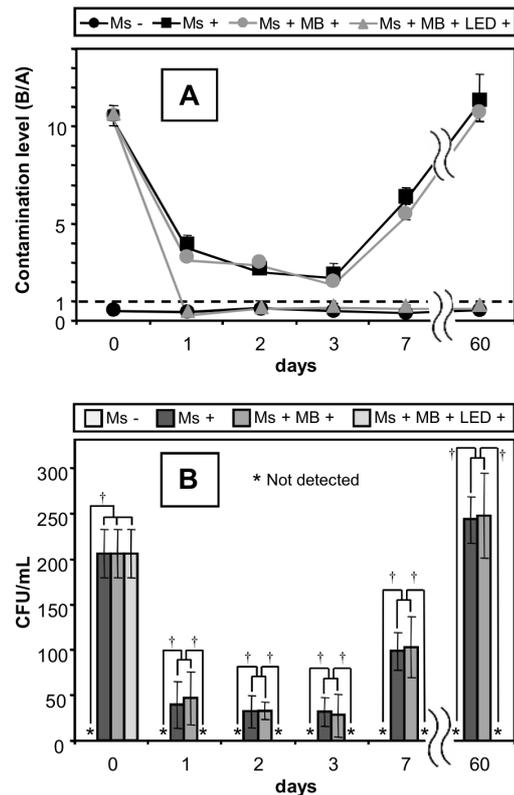


図 5. HEK293 細胞の PBS による洗浄後の aPDT の効果確認。A: MycoAlert による確認、B: 培養法による確認。

このように aPDT により HEK293 細胞に混入した *M. salivarium* を除去できることがわかった。

さらに、細胞内侵入性を持つマイコプラズマなど他の種々のマイコプラズマ、あるいは他の多くの培養細胞などに有効な普遍的方法の確立を試みた。その結果、*M. salivarium* 以外のマイコプラズマについて、マイコプラズマ培養用液体培地中の *M. hominis* ならびに *M. fermentans* も MB と光照射により殺菌可能であることがわかった。したがって、多くのマイコプラズマに対して aPDT は有効であると考えられる。

また、細胞に対してはそれぞれの細胞により aPDT に対する感受性が大きく異なる事がわかった。例えばヒト正常歯肉線維芽細胞である Gin-1 細胞においては HEK293 細胞が細胞死を起こさない条件下においてもほぼ完全に細胞死が誘導された。また、反対にマウスの単球・マクロファージ系細胞 RAW264.7 細胞は HEK293 細胞と同程度に aPDT に耐えることがわかった。

以上のことから培養細胞に混入したマイコプラズマはそれぞれの細胞に適した条件検討を行う事により aPDT で除去できることが可能であることがわかった。

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 1 件)

Akira Hasebe, Isao Ishikawa, Haque M. Shamsul, Makoto Ohtani, Taku Segawa, Ayumi Saeki, Naoho Tanizume, Manabu Oouchi, Yoshihide Okagami, Teruo Okano, and Ken-ichiro Shibata. Mycoplasma removal from cell culture using antimicrobial photodynamic therapy. Photomedicine and Laser Surgery. 査読有, Vol. 31, No. 3, 2013, pp. 125-131.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.den.hokudai.ac.jp/saikin/achievements/2013.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷部 晃 (HASEBE, Akira)
北海道大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：90281815

(2) 研究分担者

柴田 健一郎 (SHIBATA, Ken-ichiro)
北海道大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：50145265
(平成 25 年 8 月 2 日削除)

(3) 連携研究者

なし