

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：82406

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659628

研究課題名(和文)細菌特異的集積を示す光増感剤を用いた局所多剤耐性菌感染症に対する光学的診断・治療

研究課題名(英文) Photodynamic diagnosis and treatment for local multiple-drug-resistant bacterial infection using photosensitizers that preferably accumulate into bacteria.

研究代表者

守本 祐司 (MORIMOTO, YUJI)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・医学教育部医学科専門課程・准教授)

研究者番号：10449069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：光増感剤としてメチレンブルーを用いた光線力学的治療(MB-PDT)は、難治性MRSA膝関節炎モデルに対し、感染局所への好中球の遊走および集積を強力に賦活化して治療効果を発揮した。また、前処置としてMB-PDTを行えば、その後に感染を生じた時、速やかに好中球を感染局所に遊走・集積させて感染を抑制した。他方、MB-PDTにおける抗生物質(リネゾリドもしくはバンコマイシン)の併用効果は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：With an established murine intractable MRSA arthritis model using bioluminescent MRSA and resin microparticle, we examined both therapeutic and preventive effect of PDT using methylene blue. Although bioluminescent intensity of MRSA was not diminished immediately after PDT, it was gradually decreased for 6 days after PDT. The therapeutic effect was lost by intravenous administration of anti-neutrophil antibody. Moreover, pre-conditioning PDT on the normal knee joint prevented an exacerbation of MRSA infection of the knee joint. The preventive effect was also lost by intravenous administration of anti-neutrophil antibody. On the other hand, an adjuvant use of antibiotics for MRSA either linezolid or vancomycin exerted no enhancing effect of MB-PDT, suggesting that they might have inhibited the PDT induced accumulating effect of neutrophils into infected lesions.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：光線力学療法 薬剤耐性菌 発光細菌 MRSA メチレンブルー 膝関節炎

1. 研究開始当初の背景

整形外科領域の重症外傷や手術等に伴う細菌感染症は、血流の乏しい組織に対し人工物を扱う等の理由で、極めて難治性である。特に多剤耐性菌による感染症を生じると、数ヶ月にもおよぶ長期間の抗生剤投与と、数次にわたる外科的廓清や持続灌流等の処置を要する。しかし、その間にも局所の正常組織構造は破壊され、また感染が全身に拡大して原感染巣が特定できなくなる等、患者の Quality of life (QOL) が著しく損なわれる。よって、抗生剤治療とは異なる新たな感染症治療法の登場が切望される。その有力な候補に、光線力学的治療 (PDT) がある。PDT は、光照射と腫瘍親和性感感受性物質 (光増感剤) を併用した治療法で、既に肺がんや胃がん等に対し臨床応用されている。光増感剤は、固有の吸収波長光の照射により励起・活性化され、フリーラジカルを産生して病変組織を破壊する。

PDT を細菌感染症の治療に応用する試みが近年なされつつある。しかしながら、*in vitro* における殺細菌効果を述べた報告は多いものの、*in vivo* における有効性を述べた報告は少ない。生体において PDT の治療効果発揮における何らかの阻害因子が存在すると考えられたが、その詳細は明らかでなかった。

我々はこれまで、マウス膝メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) 関節炎に対するフォトリン®を用いた PDT の治療効果に関する検討を行ってきた。その中で、PDT が細菌だけでなく関節内好中球も同時に傷害し、PDT の直接的な殺細菌作用のみでは感染治療効果が発揮されないこと(1)、光増感剤の投与方法や照射光の条件を最適化すれば、PDT の好中球に対する傷害作用を低減しつつ殺細菌作用を発揮し、さらにケモカイン産生を介した感染局所への好中球の集積効果を発揮し、感染を有効に治療できることを示した(2)。すなわち、細菌感染症に対する PDT の鍵は、光増感剤の細菌に対する選択的親和性と、感染局所の好中球を始めとする貪食細胞の温存の 2 点にあることを明らかにした。

2. 研究の目的

上記の知見をもとに、細菌に特異的な親和性を有し、好中球に対する傷害作用の少ない光増感剤を検討してきたところ、メチレンブルー(MB)やトルイジンブルー(TB)などがその有力な候補となることがわかってきた。そこで、白血球を温存しつつ殺細菌効果を発揮するメチレンブルー(MB)を用い、難治性マウス MRSA 膝関節炎モデルに対する PDT(MB-PDT)の治療効果および予防効果を検討した。

3. 研究の方法

(1) 難治性 MRSA マウス膝感染症モデルの作製

C57BL/6 マウスの左膝関節内にルシフェラーゼ発現発光 MRSA 1×10^8 CFU をポリスチレン製微粒子($\phi 3.2 \mu\text{m}$)とともに接種し、難治性 MRSA 膝関節炎モデルを作製した (Fig. 1)。

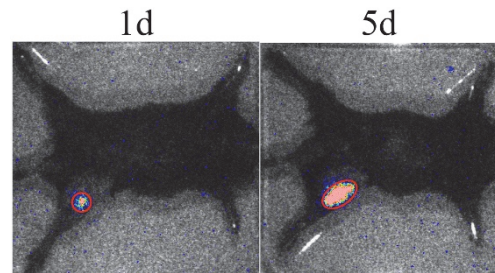


Fig. 1. Images of the bioluminescent MRSA-infected left knee joint of the MRSA arthritis model(3).

(2) PDT

感染モデル作製の 1 日後に MB-PDT を実施したものを治療的 PDT (以下 Th-PDT) とした。また、感染モデル作製の 1 日前に前処置として MB-PDT を実施したものを予防的 PDT (以下 Pre-PDT) とした。

(3) 感染の評価方法

In vivo imaging system (IVIS)を用いてその後の感染状態を経時的に観察した。さらに、MB-PDT と同時に抗好中球抗体 (抗 GR-1 抗体) を全身投与して感染状態の観察を行い、PDT と好中球との関係を検討した。

(4) PDT における抗生物質との併用効果

抗 MRSA 薬であるリネゾリドまたはバンコマイシンの全身投与を PDT と併用し、より強力な治療効果が得られるかどうかを検討した。難治性 MRSA マウス膝感染症モデルを用いて以下の 6 つの群を作成し、各治療実施後の関節炎の状態を *in vivo* イメージング装置を用いて経時的に観察した。1. 未治療群、2. リネゾリド投与群、3. バンコマイシン投与群、4. リネゾリド投与+PDT 併用群、5. バンコマイシン投与+PDT 併用群、6. PDT 単独実施群。

4. 研究成果

(1) 治療 PDT(Th-PDT)および予防 PDT(Pre-PDT)

Th-PDT において、治療効果が得られた至適な光照射エネルギーは $50 - 80 \text{ J/cm}^2$ で、いわゆる Biphasic dose response を示した。しかし、照射光のエネルギーによらず PDT 直後には細菌の発光強度の変化はなく、PDT 実施翌日から徐々に発光強度が低下し、6 日後に測定限界以下まで低下した (Fig. 2)。抗 GR-1 抗体を用いて末梢血好中球数を減少させるとこの効果は抑制された (Fig. 3)。

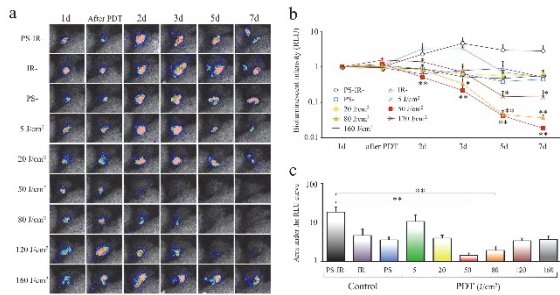


Fig. 2. a: Time course series of bioluminescent images after therapeutic PDT (Th-PDT) in each irradiation energy group. b: A line graph of time courses of bioluminescent intensity after Th-PDT in each irradiation energy group. c: Comparison of the area under the RLU curve (AUC) indicated in b. n = 5 each. *P < 0.05, **P < 0.01(3)

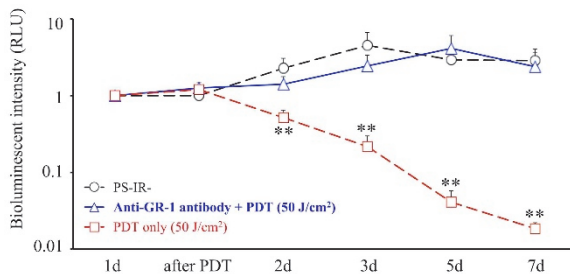


Fig. 3. Comparison of time courses of the bioluminescent intensity in the PS-IR- group, the anti-GR-1 antibody + Th-PDT (50 J/cm²) group and the Th-PDT (50 J/cm²) group. n = 5 each. **P < 0.01(3)

一方 Pre-PDT は、光照射エネルギーが 50 J/cm² の時、その後の膝関節内感染起炎菌の発光強度を-2 log スケールまで強力に抑制した (Fig. 4)。そして抗 GR-1 抗体によりこの抑制効果は失われた (Fig. 5)。

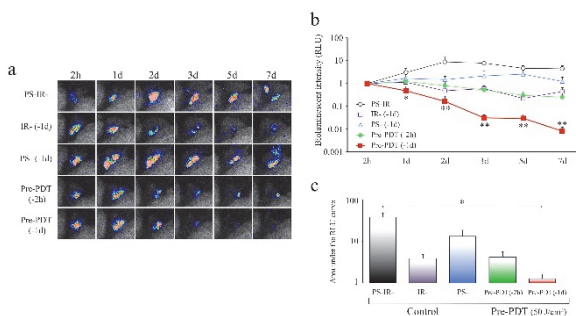


Fig. 4. a: Time course series of bioluminescent images after preventive PDT (Pre-PDT) in each group. b: A line graph of time courses of bioluminescent intensity after Pre-PDT in each group. c: Comparison of the area under the RLU curve (AUC) of the data indicated in b. n = 5 each. *P < 0.05, **P < 0.01(3)

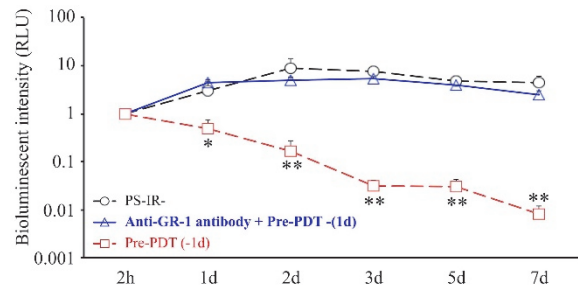


Fig. 5. Comparison of time courses of bioluminescent intensity in the PS-IR- group, the anti-GR-1 antibody + Pre-PDT (-1d) group and the Pre-PDT (-1d) group. n = 5 each. *P < 0.05, **P < 0.01(3)

(2) PDT における抗生物質との併用効果

治療効果が最も高かったのは PDT 単独実施群であった。リネゾリド投与群およびバンコマイシン投与群は治療効果が十分ではなかった。当初の予想と異なり、リネゾリド投与 + PDT 併用群およびバンコマイシン投与 + PDT 併用群の治療効果は PDT 単独実施群よりも劣っていた (Fig. 7)。

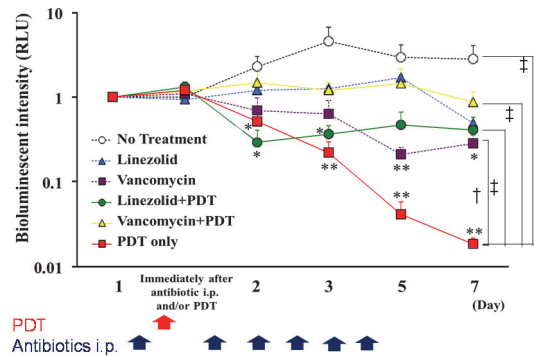


Fig 7. Mean (\pm SE) bioluminescent intensity values in the six groups (n=5 each) measured over the course of the study. * P<0.05; ** P<0.01 (compared with the value at day 1 in each group) : †P<0.05; ‡P<0.01 (compared with PDT only group) (4)

(3) 考察

MB-PDT は、感染局所への好中球の遊走および集積を強力に賦活化して治療効果を発揮した。また、前処置として MB-PDT を行えば、その後に感染を生じた時、速やかに好中球を感染局所に遊走・集積させて感染を抑制した。本法は、菌種を問わず、外傷に伴う感染症の治療や、骨・関節手術における術後感染の予防などに広く応用できる可能性がある。

他方、抗生物質と PDT の併用効果は認められず、PDT 単独に比してかえって悪化した。抗 MRSA 薬は炎症性サイトカインの活性を阻害するとされており、PDT の感染局所への好中球集積効果を阻害したため治療効果がむしろ低下したものと考えられた。局所の細菌感染症に対する治療において、PDT は強力な治

療効果を発揮するが、抗生物質の全身投与を併用しても治療効果は増強されない。

<文献>

1. Tanaka M, Kinoshita M, Yoshihara Y, Shinomiya N, Seki S, Nemoto K, Morimoto Y. Influence of intra-articular neutrophils on the effects of photodynamic therapy for murine MRSA arthritis. *Photochem Photobiol* 2010; 86(2):403-409.
2. Tanaka M, Kinoshita M, Yoshihara Y, Shinomiya N, Seki S, Nemoto K, Hamblin MR, Morimoto Y. Photodynamic therapy using intra-articular Photofrin for murine MRSA arthritis: biphasic light dose response for neutrophil-mediated antibacterial effect. *Lasers Surg Med* 2011; 43(3):221-229.
3. Tanaka M, Mroz P, Dai T, Huang L, Morimoto Y, Kinoshita M, Yoshihara Y, Nemoto K, Shinomiya N, Seki S, Hamblin MR. Photodynamic therapy can induce a protective innate immune response against murine bacterial arthritis via neutrophil accumulation. *PLoS one* 2012; 7(6):e39823.
4. Tanaka M, Mroz P, Dai T, Huang L, Morimoto Y, Kinoshita M, Yoshihara Y, Shinomiya N, Seki S, Nemoto K, Hamblin MR. Linezolid and vancomycin decrease the therapeutic effect of methylene blue-photodynamic therapy in a mouse model of MRSA bacterial arthritis. *Photochem Photobiol* 2013; 89(3):679-682.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

1. Tanaka M, Mroz P, Dai T, Huang L, Morimoto Y, Kinoshita M, Yoshihara Y, Shinomiya N, Seki S, Nemoto K, Hamblin MR. Linezolid and vancomycin decrease the therapeutic effect of methylene blue-photodynamic therapy in a mouse model of MRSA bacterial arthritis. *Photochem Photobiol* 2013; 89(3):679-682.
2. 守本祐司. 光線力学療法で感染症を撃退. *光アライアンス* 2013; 24:1-5.
3. 守本祐司, 田中優砂光, 木下学. 【光線力学診断・治療の最新動向】 PDTにおける好中球の重要性. *日本レーザー医学会誌* 2013; 34(2):133-137.
4. 十河基文, 守本祐司. 細菌感染症の新しいアプローチ「光殺菌治療. *クインテッセンス* 2013; 32:112-123.
5. Tanaka M, Mroz P, Dai T, Huang L, Morimoto Y, Kinoshita M, Yoshihara Y, Nemoto K, Shinomiya N, Seki S, Hamblin MR. Photodynamic therapy can induce a protective innate immune response against murine bacterial arthritis via neutrophil accumulation. *PLoS one* 2012; 7(6):e39823.
6. Tanaka M, Kinoshita M, Yoshihara Y, Shinomiya N, Seki S, Nemoto K, Hirayama T, Dai T, Huang L, Hamblin MR, Morimoto Y. Optimal Photosensitizers for Photodynamic

Therapy of Infections Should Kill Bacteria but Spare Neutrophils. *Photochem Photobiol* 2012; 88(1):227-232.

7. Huang YY, Tanaka M, Vecchio D, Garcia-Diaz M, Chang J, Morimoto Y, Hamblin MR. Photodynamic therapy induces an immune response against a bacterial pathogen. *Expert review of clinical immunology* 2012; 8(5):479-494.
8. Huang L, Xuan Y, Koide Y, Zhiyentayev T, Tanaka M, Hamblin MR. Type I and Type II mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: an in vitro study on gram-negative and gram-positive bacteria. *Lasers Surg Med* 2012; 44(6):490-499.
9. 田中優砂光, 吉原愛雄, 守本祐司, Hamblin M, 根本孝一. 光線力学療法(PDT)を用いた骨関節手術後感染の予防戦略. *整形・災害外科* 2012; 55:75-79.
10. 田中優砂光, 守本祐司, 木下学, 吉原愛雄, 四ノ宮成祥, 関修司, 斎藤大蔵, 宮崎裕美, Hamblin MR, 根本孝一. 光線力学療法(PDT)の局所細菌感染症への応用 化膿性関節炎モデルを用いた実験的研究. *防衛医科大学校雑誌* 2012; 37(4):243-256.
11. 田中優砂光, 木下学, 吉原愛雄, 四ノ宮成祥, 関修司, 根本孝一, 守本祐司. 光線力学療法(PDT)の生体防御能賦活効果. *光アライアンス* 2012; 23:42-45.
12. Tanaka M, Kinoshita M, Yoshihara Y, Shinomiya N, Seki S, Nemoto K, Hamblin MR, Morimoto Y. Photodynamic therapy using intra-articular Photofrin for murine MRSA arthritis: biphasic light dose response for neutrophil-mediated antibacterial effect. *Lasers Surg Med* 2011; 43(3):221-229.

[学会発表] (計 6 件)

1. 田中優砂光 他. リネゾリドおよびバンコマイシンはMRSA関節炎に対する光線力学療法(PDT)の治療効果を減弱させる. 第23回日本光線力学学会学術講演会. 2013年06月. 旭川市.
2. Toshikatsu Horiuchi et al. Bactericidal effect of photodynamic therapy is attenuated by antibiotics. 最先端研究開発支援プログラム(FIRST)「ナノバイオテクノロジーが先導する診断・治療イノベーション」(NanoBio First) 国際シンポジウム. 2014年02月. 東京
3. 守本祐司 他. 光線力学の基礎と臨床応用への展望 PDTによる細菌性関節炎への治療ならびに予防. 第22回日本光線力学学会学術講演会(招待講演). 2012年07月. つくば市.
4. 守本祐司 他. 光線力学療法により細菌感染症を撃退. 東京都国立市医師会(招待講演). 2012年10月. 東京都.
5. Masamitsu Tanaka et al. Photodynamic therapy can induce non-specific protective immunity

against a bacterial infection. Photonics West
2012_BIOS. 2012年1月. San Jose, CA, USA.

6. Michael R Hamblin et al. Photodynamic therapy can induce a protective immune response against a bacterial pathogen. 14th Congress of the European Society for Photobiology (招待講演). 2012年9月. Geneva, Switzerland.

[その他]

ホームページ等

<http://ndmc-ipb.browse.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

守本 祐司 (MORIMOTO, Yuji)

防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・准教授

研究者番号：10449069

(2)研究分担者

木下 学 (Kinoshita, Manabu)

防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・准教授

研究者番号：70531391

(3)研究協力者

Hamblin, Michael R. ()

Wellman Center for Photomedicine,
Massachusetts General Hospital, Boston,
Massachusetts, United States of America,

研究者番号：