

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年2月11日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791988

研究課題名（和文） 角膜感染症に対する光線力学的療法

研究課題名（英文） Efficacy of photodynamic chemotherapy on corneal bacterias

研究代表者

佐々木 崇暁（SASAKI TAKAAKI）

広島大学・病院・病院助教

研究者番号：50403548

研究成果の概要（和文）：光線力学的抗微生物化学療法（photodynamic antimicrobial chemotherapy: PACT）は黄色ブドウ球菌、MRSA に対し殺菌効果を示した。また、グラム陰性菌である緑膿菌、大腸菌、セラチア菌に対しては、EDTA を添加することで殺菌効果を示した。一方、PACT は正常なヒト培養角膜実質細胞に対し細胞障害性を認めなかった。現時点で検討された病原体に対しては、その種類によらず PACT の有効性が確認され、*in vivo* における PACT の有効性を検討する実験に重要な情報をもたらした。

研究成果の概要（英文）：Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) had a bactericidal effect *in vitro* on *S. aureus* and methicillin-resistant *S. aureus*. It had also a bactericidal effect on gram negative bacterias by adding EDTA. On the other hand, it was not harmful influence to cultured corneal cells. PACT had useful effect on the investigated pathogens, and it had bring very important informations to *in vivo* experiments.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：眼微生物学・感染症学

1. 研究開始当初の背景

（1）光線力学的療法 (photodynamic therapy; PDT) は、本来癌細胞に集積した光増感剤（光感受性物質）を光で励起することで標的癌細胞を死滅させる治療法である。光増感剤は、増殖段階にある細胞に集積する性質を持つため、PDT は癌以外の増殖組織を破壊することが可能である。光増感剤の1つであるフォトフリン (photofrin®) は、早期肺癌、表在性食道癌、表在性早期胃癌、子宮頸部初期癌および異形成に対し承認が得られ、ビスダイ

(visudyne®) は、眼科領域での加齢黄斑変性症における脈絡膜新生血管の破壊閉塞治療として、2004 年以降わが国でも広く行われている。また、PDT はその他に細菌 (Biel MA., *Methods Mol Biol.* 2010, Hamblin M., *Photochem. Photobiol. Sci.* 2004)、ウイルス (Moore C. et al., *Infect. Immun.* 1972)、アメーバ (Chen Z. et al., *Br J Ophthalmol* 2010) などの病原微生物への殺菌効果もある。工業分野では抗菌剤として様々な製品の表面加工剤に添加使用されているが、医学領域では、PDT による抗菌治療はいまだ

一般化されていない。その主な理由は、臨床的に効果と副作用のバランスのとれた光増感剤が無いことである。メチレンブルー色素、クロリン系薬剤、フタロサイアニン系薬剤など複数の光増感剤による抗菌治療が *in vitro* 実験や動物を使用した *in vivo* 実験段階にあるが、臨床的に認可された薬剤はない。

(2) 本研究では、新しく開発された第四級アンモニウム塩担持クロリン誘導体 (TONS シリーズ) を用いる。TONS シリーズの斬新性を要約すると、1) 本薬剤は動物例での使用で高い殺菌効果が認められていること、2) 動物実験で重篤な副作用が発生していないことである。今回の研究に先立ち、我々はアニオン性の光増感剤 ATX-S10 (Na) による殺菌効果を *in vitro* で検討しグラム陽性球菌には MRSA も含めて殺菌効果が認められたが、グラム陰性菌には殺菌効果は認められなかった。その原因として、グラム陽性菌では ATX-S10 (Na) が菌内に取り込まれて DNA 合成阻害を起こすが、グラム陰性菌は外膜を持つために ATX-S10 (Na) が菌内に取り込まれないためと考えた。TONS シリーズには、アニオン性クロリン誘導体である TONS501, 502 およびカチオン性誘導体である TONS503, 504 がある。アニオン性誘導体はグラム陽性菌にしか殺菌効果が期待できないが、カチオン性誘導体はグラム陽性菌のみならずグラム陰性菌にも殺菌効果が期待できる。本研究ではカチオン性誘導体である TONS504 を用いる予定である。

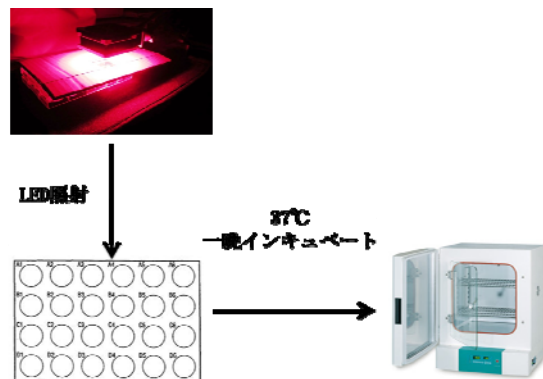
2. 研究の目的

角膜潰瘍の原因菌はさまざま、眼科的諸検査および角膜擦過物の鏡検および培養検査を行うも、原因菌を分離同定できないことも幾度となくある。その場合は、臨床所見等より複合的に原因菌を推測し、推測のもと抗菌剤を用いて治療を行っているのが現状である。なかには、抗菌剤が奏功せず、治療に難渋し、最終的には角膜穿孔や眼内炎に至り視機能を消失する場合もある。感染症に対する抗生物質使用は耐性菌出現という大きな問題を抱えている。とりわけ多剤耐性菌やバンコマイシン耐性のスーパー耐性菌は院内感染の起因菌となり、近年マスキミでも取り上げられ社会問題化している。そこで、我々は

抗生物質に頼らない新しい治療法、すなわち光線力学的療法による感染症治療法の開発と臨床応用をめざしている。本研究では角膜感染症を対象とし、新しい光増感剤 (光感受性物質) による殺菌効果ならびに角膜組織への影響を検討する。この治療法が確立すれば耐性菌感染症に対処できるのみならず、抗生物質の使用を減らすことで新たな耐性菌の出現を抑制できる画期的なアプローチとなりうる。

3. 研究の方法

(1) 各種細菌 (黄色ブドウ球菌, MRSA, 緑膿菌, 大腸菌, セラチア菌) を 1×10^7 CFU に調整した状態で TONS504 (ポルフィリン研究所) の濃度を $0.01-50 \mu\text{g/ml}$ の暴露下で LED (660nm : TONS504 の最大吸収波長, シーシーエス株式会社) 10J 照射し、その後菌液を採取し、希釈した後に標準寒天培地上に播種して 37°C , 24 時間インキュベートし、コロニーをカウントして殺菌効果を確認する。続いて、LED の照射条件を 10J, 20J, 30J と変えて同様に実験を行い殺菌効果を確認した。

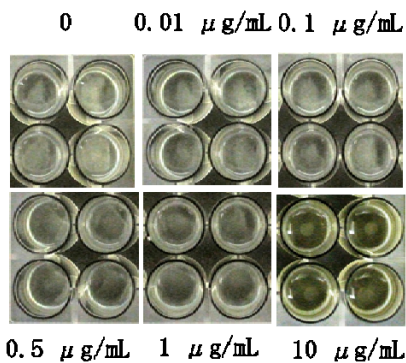


(2) TONS504 ならびに LED 照射の角膜細胞に対する細胞障害性の影響を検討するために、Cytotoxicity Detection Kit (LDH) を用いて乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性を細胞傷害性の指標として測定した。培養ヒト角膜実質細胞を培養し、TONS504 の濃度を 0.01, 0.1, 0.5, 1.0, $10 \mu\text{g/ml}$ として、培養上清内の LDH 活性を測定した。TONS504 各濃度曝露下で LED (660nm : TONS504 の最大吸収波長) 10-30J 照射し、同様に実験を行い LDH 活性を測定した。

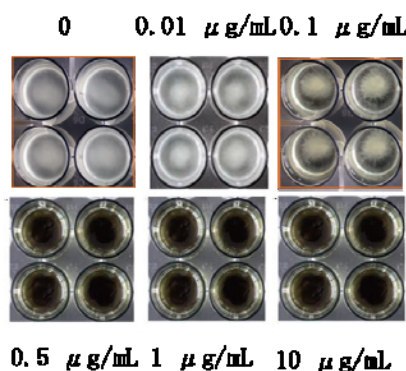
4. 研究成果

(1)

<黄色ブドウ球菌 (LED 照射なし)>



<黄色ブドウ球菌 (LED 照射 10J)>



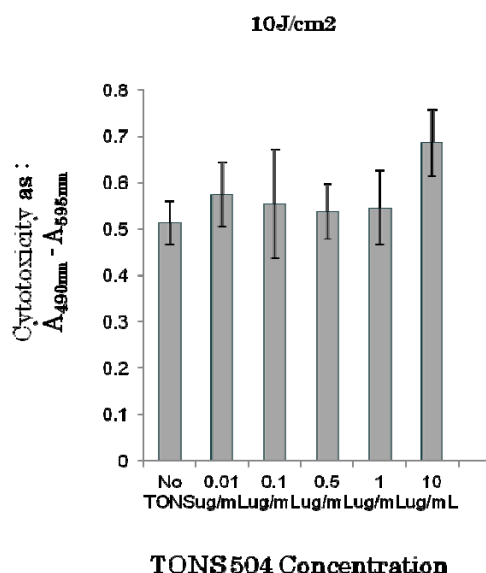
病原体	LED (J)	TONS 504 濃度 (mg/ml)				
		0	0.1	0.5	1	10
黄色ブドウ球菌	0	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	-	-
	20	+	+	-	-	-
	30	+	+	-	-	-
	30	+	+	-	-	-
MRSA	0	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	+	-
	20	+	+	+	-	-
	30	+	+	+	-	-
	30	+	+	+	-	-
緑膿菌	0	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	-	-
	20	+	-	-	-	-
	30	+	-	-	-	-
	30	+	-	-	-	-
大腸菌	0	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	-	-
	20	+	-	-	-	-
	30	+	-	-	-	-
	30	+	-	-	-	-

セラチア菌	10	+	+	+	-	-
	20	+	-	-	-	-
	30	+	-	-	-	-
	0	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	-	-
	20	+	-	-	-	-
	30	+	-	-	-	-

+: 生菌確認, -: 細菌死滅

グラム陽性菌である黄色ブドウ球菌では、0.5 $\mu\text{g/mL}$ の TONS504 を作用させたのちに 20J の LED を照射させることで殺菌効果が得られた。MRSA では、1.0 $\mu\text{g/mL}$ の TONS504 を作用させたのちに 20J の LED を照射させることで殺菌効果が得られた。LED 照射に関しては 20J と 30J の間に差は見られなかった。グラム陰性菌である緑膿菌、大腸菌、セラチアに対しては、0.1-50 $\mu\text{g/mL}$ の TONS504 を作用させたのちに 10-30J の LED を照射しても殺菌効果が全く得られなかった。しかしながら、0.05M EDTA を添加することで 1.0 $\mu\text{g/mL}$ の TONS504 を作用させたのちに 20J の LED を照射させると殺菌効果が得られた。LED 照射に関しては 20J と 30J の間に差は見られなかった。グラム陰性菌では 0.05M EDTA を添加することによりはじめて殺菌効果が確認された。

(2)



検討した TONS504 の濃度内では、LDH 活性に差はなく、無血清培地内で培養した際の上清とほぼ同等であった。TONS504 各濃度曝露下

で LED を 10-30J 照射しても各濃度間で LDH 活性に差はなかった。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

①M. A. LAtief 角膜感染症に対する光線力学療法の実用 第 16 回眼創傷治癒研究会 2012. 8. 26 奈良市

②近間泰一郎, 他 Efficacy of photodynamic antimicrobial chemotherapy on Staphylococcus aureus ARVO2012 2012. 5. 10 Fort Lauderdale (USA)

③ M. A. LAtief, et al Efficacy of photodynamic antimicrobial chemotherapy on Staphylococcus aureus 第 116 回日本眼科学会総会 2012. 4. 6 東京都

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 崇暁 (SASAKI TAKAAKI)

広島大学・病院・病院助教

研究者番号: 5 0 4 0 3 5 4 8

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: