

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 7 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861635

研究課題名(和文) 光線力学療法による角膜感染症治療の試み

研究課題名(英文) The efficacy of the photodynamic therapy (PDT) against Acanthamoeba keratitis

研究代表者

岡 奈央子 (Oka, Naoko)

愛媛大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：20403818

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,400,000円

研究成果の概要(和文)：今回我々は、光感受性物質であるメチレンブルー(以下MB)を用いたphotodynamic therapy(以下PDT)のアカントアメーバ角膜炎に対する有効性を検討した。In vitroにおいてはMB-PDT群でMB濃度依存性にアカントアメーバの呼吸活性率の低下がみられた。またMB-PDTの抗アメーバ効果は光照射量依存性であることが認められた。MB-PDTの生体への毒性試験では、光照射後、角膜混濁、虹彩充血が観察されたが1週間で角膜の透明性は回復した。アカントアメーバ角膜炎モデルの作成も試みたが、現在完成には至っておらず今後検討予定である。

研究成果の概要(英文)：We sought to elucidate the efficacy of the photodynamic therapy (PDT) against Acanthamoeba keratitis using methylene blue (MB) which is a photosensitizer. In vitro, Antiacanthamoeba activity was evaluated by checking the respiratory activity of the amoeba. MB-PDT suppressed the respiratory activity of trophozoites in an MB-concentration-dependent manner. Also anti-amoebic effect of MB-PDT was observed to be light dose dependent. Besides, we examined the toxicity of PDT treatment in vivo using C57BL/6 mouse corneas with epithelial defects, and found that MB-PDT did not cause any appreciable damage to the cornea. Thus, we conclude that PDT treatment would produce minimal toxicity in vivo. Although our results show that MB-PDT is efficacious in vitro, these results may not correlate with in vivo efficacy; therefore, further animal studies are under way to test the in vivo efficacy of this treatment for Acanthamoeba.

研究分野：眼感染症

キーワード：アカントアメーバ 光線力学療法 PDT メチレンブルー

1. 研究開始当初の背景

近年、頻回交換型の使い捨てソフトコンタクトレンズ(SCL)とマルチパーパスソリューション(MPS)使用者にアカントアメーバ角膜炎が急増している。平成21年12月の国民生活センターの発表ではMPSなどのケア用品のアカントアメーバに対する消毒力不足やユーザーの不適切なコンタクトレンズ使用状況が明らかとなり各メディアに大きく取り上げられ社会問題となった。この角膜炎の治療に関しては難渋することが多く時には長期間の入院生活が必要となったり、場合によっては角膜移植などの手術加療を要したりこともある。コンタクトレンズ使用者の多くが若年者であり重篤な視機能障害を残すことも多いことがこの疾患の悲劇的な色合いを濃くしている。過去における国内での絶対的な症例数は多くなくその為アカントアメーバ角膜炎に関する研究は皆無といっても過言ではない。アカントアメーバの角膜に対する感染機序を知ることは治療方法の開発にとって重要であり、具体的にはアカントアメーバ角膜炎の感染成立と重篤化にはアカントアメーバの角膜上皮への接着、角膜上皮内への侵入、角膜実質への侵入、角膜実質における炎症の拡大の4つのステップが存在するとされるがその詳細に関しては残念ながら現在のところ詳しいことは判明していない。

もう一方で治療を困難としている原因はアカントアメーバに対する特效薬がないことがある。現在使用されている治療薬としてはポリヘキサメチレンピグアニド(PHMB)、グルコン酸クロルヘキシジンなどの消毒剤や、抗真菌薬、抗原虫薬などの局所投与であるが、すべて限定的な効果しか有していない。さらに、アカントアメーバは通常は栄養体として活発に活動を行うがひとたび生存環境が悪くなるとシストへと形態変化を起こし外的環境から身を守ろうとする。このようにアカントアメーバは外的環境に応じて栄養体からシストに変化するため薬剤のターゲットを絞りにくい一因となっている。近年細菌や真菌など感染症を引き起こす微生物に対して光感受性物質(photosensitizer, 以下 PS)を用いた治療法の研究が行われ photodynamic antimicrobial chemotherapy

(PACT)と呼ばれている。PSとし

て代表的なものとしてメチレンブルー、トルイジンブルー、ローズベンガルなどがあり、各 PS に特定の励起光を当てることで励起状態を引き起こし、以下の二種類の反応を生じる。高反応性を示す対電子を有するフリーラジカルを発生させるものと、もう一種類は三重項酸素分子を細胞毒性を有する一重項酸素分子に状態変化させる反応であり、特に後者の酸化ストレスは微生物や細胞等に与える影響は大きいと言われている。眼科領域で使用されている PS として米国の FDA に認可されているのは visudyne (Novartis 社)のみであり加齢黄斑変性に対して実際日本でも多くの施設で PDT による加療が行われている。

2. 研究の目的

今回の目的は PS を用いた PDT をアカントアメーバ角膜炎に対して行うことである。最終的には PS を点眼で投与しレーザーを角膜に照射することでアカントアメーバを殺すことが出来ればアカントアメーバ角膜炎への有効なアプローチの一つとして選択肢が増えることが期待される。

3. 研究の方法

1) In vitro における PDT によるアカントアメーバへの効果

光源は MB の最大吸収波長である 660nm のフィルタープロップ付きのハロゲンランプ(LC-122A, LumaCare 社)を使用した。培養した *Acanthamoeba castellanii* (ATCC50370) の栄養体またはシストを遠心分離により回収し 2×10^6 amoeba の pellet とした。各濃度の MB 溶液 (0.05、0.1、0.25、0.5mM) で懸濁し 10 分間暗室にてインキュベートさせ洗浄した後、2ml の PBS で懸濁し 35mm dish に移し替え、dish 上からの照射距離が一定になる様にプロップを固定し光を照射した。処理後のアカントアメーバ懸濁液を回収し Bacstain-CTC Rapid Staining Kit (for Microscopy) (株同仁化学研究所) で染色し蛍光プレートリーダーにて蛍光強度の測定を行いアカントアメーバの呼吸活性を生存のマーカーとすることで抗アカントアメーバ効果を評価した。対照として無処理群、MB(+)照射(-)群、MB(-)照射(+)群をとり、無処理群の蛍光強度を 100%とし、各処理群の残存呼吸活性を求めた。また照射量による抗アメーバ効果の違いを調べるため、照射時間別 (10、20、30 分間の連続照射と 10 分間×3 回のパルス照射) に PDT を行い検討した。さらに抗アメーバ薬として局所投与で使用されることの多い消

毒剤のポリヘキサメチレンピグアニド (PHMB) 抗真菌薬のアムホテリシン B (AMPH-B) とポリコナゾール (VRCZ) を栄養体と 60 分間接触させた後 0.1mM 濃度で MB-PDT を行い、抗アメーバ薬と MB-PDT との併用効果を検討した。

2) PDT の生体への毒性試験

白色家兎を用いてウサギ角膜上皮を剥離した後に 0.5mM の MB 水溶液を 5 分間隔で 6 回点眼した。その後、照射装置を用いて 660nm の光を 10 分間照射した (MB+PDT+群)。また、対照として、MB-PDT⁻、MB⁻PDT⁺、MB+PDT⁻ の各群を置き、処置 1 週間後の角膜の細隙灯顕微鏡所見並びに組織学所見を検討した。上皮創傷治癒や内皮細胞への影響を調べた。

3) アカントアメーバ角膜炎モデルに対する PDT の効果

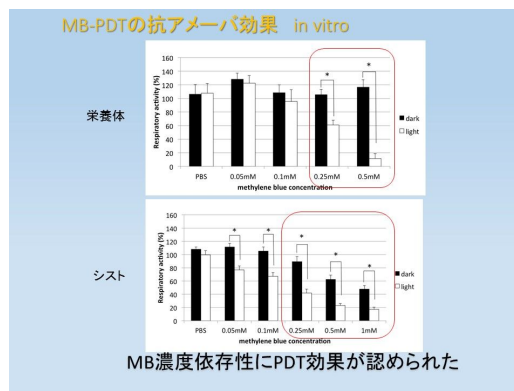
全身麻酔をかけたチャイニーズハムスター (アカントアメーバはヒト、豚、チャイニーズハムスターの角膜に親和性を有する) の片眼の角膜上皮に 27G 針で格子状に傷をつくり $1 \times 10^7/\text{ml}$ の濃度のアカントアメーバ栄養体懸濁液を 50 μl 点眼しソフトコンタクトレンズを装着させ眼瞼縫合を施す。一週間後角膜炎を生じたハムスターに対して、PS (照射なし) 群、照射 (PS なし) 群、PS + 照射群のそれぞれにおいて角膜炎の治癒率と罹患期間について検討する。また治療 2 週間後にハムスターを屠殺し患眼を摘出し 4% パラホルムアルデヒド固定後角膜切片を作製し HE 染色による組織の観察とファンギフローラ染色での残存シストの検出を行う。

4. 研究成果

1) In vitro における PDT によるアカントアメーバへの効果

MB(-)照射(+)群とMB(+)照射(-)群では無処理群と比較して栄養体の呼吸活性率に有意差を認めなかったのに対して MB-PDT 群では MB 濃度依存性に呼吸活性率の低下がみられた。(図 1)シストについても同様に MB 濃度依存性に呼吸活性率の低下がみられた。また MB-PDT の抗アメーバ効果は照射量依存性であることが認められた。抗アメーバ薬との併用効果については PHMB と AMPH-B では MB-PDT との併用によって相乗効果がみられた。一方、VRCZ と MB-PDT との併用においては VRCZ 単独と比較して呼吸活性率に有意差を認めなかった。

図1 In vitro における PDT によるアカントアメーバへの効果



2) PDT の生体への毒性試験

MB+PDT+においてのみ、照射後、角膜混濁、虹彩充血が観察された (図2) が、1 週間後角膜も透明性が回復し、炎症所見も消失した。また、上皮欠損は、どの群も同様に治癒した (図3)。処置直後の角膜内皮細胞は正常であった。

処置後1週間における組織学的検討でも大きな障害はなく、MB+PDT+群においてのみ、実質浅層の角膜実質細胞の消失が認められた。(図4)

図2 PDT処置後の前眼部写真

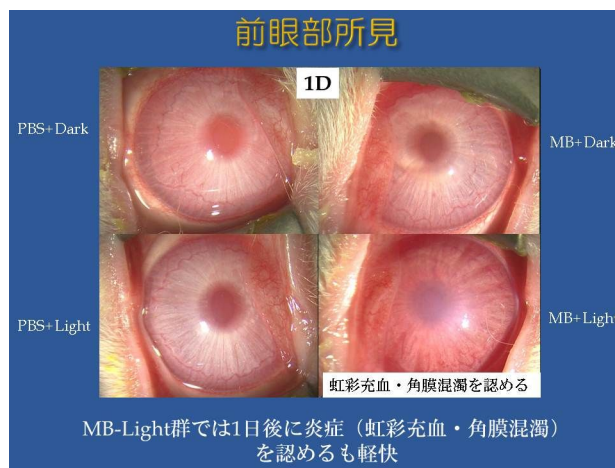


図3 角膜上皮創傷治癒

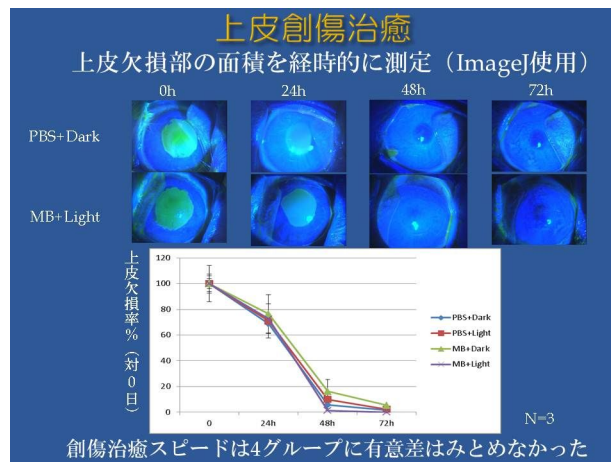
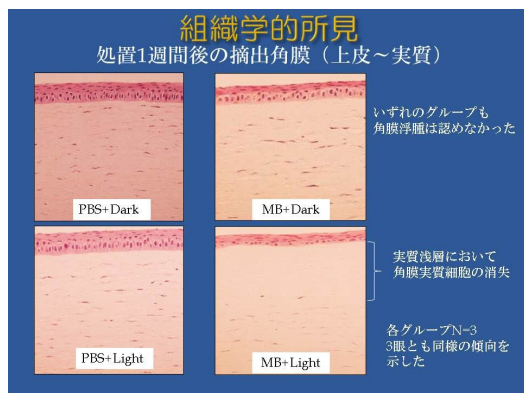


図4 PDT 処置後 1 週間の角膜組織学的所見



3) アカントアメーバ角膜炎モデルに対する PDT の効果
 チェイニーズハムスターのアカントアメーバ角膜炎モデルの作成ができず、In vivo における PDT の治療効果は確認できなかった。

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 2 件)

1. Yamaguchi S, Suzuki T, Kobayashi T, Oka N, Ishikawa E, Shinomiya H, Ohashi Y. Genotypic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from ocular infection. *J Infect Chemother.* 2014; 20:407-11. 査読有
2. Mochizuki Y, Suzuki T, Oka N, Zhang Y, Hayashi Y, Hayashi N, Gotoh N, Ohashi Y. *Pseudomonas aeruginosa* MucD protease mediates keratitis by inhibiting neutrophil recruitment and promoting bacterial survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 55:240-6, 2014 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Naoko Oka, Takashi Suzuki, Naoki Hayashi, Naomasa Gotoh, Yuichi Ohashi. Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* isolates associated with keratitis. The 2015 Asia- Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting, パシフィコ横浜, Yokohama, Japan, February 16th-19th, 2015
2. 岡奈央子, 鈴木崇, 林直樹, 後藤直正, 大橋裕一 緑膿菌角膜炎における臨床所見と分離株の鞭毛運動能の関連について. 第 51 回日本眼感染症学会 2014 7/4, 東京国際フォーラム
3. Naoko Oka, Takashi Suzuki, Tomoyuki Inoue, Takeshi Kobayashi, Kozaburo Hayashi, Yuichi Ohashi. Distribution of glycoprotein B and UL144 genotypes in immunocompetent patients with cytomegalovirus endotheliitis and iridocyclitis. The Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting, Orlando U.S., May 6th-9th, 2014

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
 出願状況 (計 0 件)
 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
 ホームページ等

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
 岡 奈央子 (Oka, Naoko)
 愛媛大学・医学部附属病院・医員
 研究者番号: 20403818
- (2) 研究分担者
 なし
- (3) 連携研究者
 なし