

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861694

研究課題名(和文)多剤耐性緑膿菌に対する5-アミノレブリン酸を使用した光線力学療法

研究課題名(英文) Photodynamic therapy for multiple-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* using 5-aminolevulinic acid

研究代表者

坂原 大亮 (Sakahara, Daisuke)

大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：30647912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：in vitroにおいて、5-アミノレブリン酸(5-ALA)を投与した緑膿菌では、総ポルフィリン量は増加し、5-ALAとEDTAを同時に加えたものでは、プロトポルフィリン9が著明に増加した。5-ALA単独では、緑膿菌に光線力学療法を行っても殺菌効果は認めなかったが、5-ALAとEDTAで行ったものでは、緑膿菌の制菌作用を認めた。最適な光線の波長は410 nmであった。今後は、in vivoでの検証を進める必要がある。

研究成果の概要(英文)：Total porphyrin production was increased when *P. aeruginosa* was treated with ALA, while PpIX was also increased markedly when ALA and EDTA were added simultaneously. A bactericidal effect on *P. aeruginosa* was not observed when PDT was conducted using ALA alone, although a bacteriostatic effect was observed after treatment with both ALA and EDTA. The optimal LED wavelength for PDT was 410 nm. Further investigations are needed to determine whether PDT combined with ALA and EDTA treatment has a bacteriostatic effect in vivo.

研究分野：形成外科

キーワード：緑膿菌 光線力学療法 5-アミノレブリン酸 EDTA

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞に対する PDT の作用機序

PDT はポルフィリン関連化合物が有する腫瘍組織・新生血管への特異的な集積と、光の惹起により発生する一重項酸素の強い細胞破壊効果を利用した治療方法である。この生成された一重項酸素が細胞膜やミトコンドリアを障害し細胞死を誘導する作用と、血管内皮細胞の障害や血栓の形成により血流遮断作用を引き起こすことにより、悪性腫瘍細胞を死滅させる。

(2) グラム陽性菌に対する PDT の作用機序

Nitzan(Curr. Microbiol.2001)らは、グラム陽性菌はポルフィリン誘導体による抗菌活性に感受性があり、PDT による抗菌作用機序は2つあると報告している。1つめの機序は、光により惹起された光感受性物質がポルフィリン誘導体となり、細菌の DNA の合成を阻害することである。2つめは、ポルフィリン誘導体が直接細胞膜に作用し、細胞膜破壊による細胞質の漏出および膜輸送システム酵素の不活性化を誘導し、細菌を死滅させる機序である (Hamblin and Hassan.Photochem Photobiol.2004)。

2. 研究の目的

(1) これまでのグラム陰性菌に対する PDT

上記のごとく、グラム陽性菌感染症に対する PDT の有効性の報告は散見されるが、グラム陰性菌に対する PDT の有用性の報告は皆無である。グラム陰性菌は細胞膜の2重構造や biofilm、薬剤排出ポンプの存在により PDT が効きにくいとされている (Malik. Photochem Photobiol. 1992)。また、MDRP は様々な色素を産生し、有効な波長も不明である。そこで今回我々は、光感受性物質として皮膚悪性腫瘍に対する PDT で安全性の確立されている 5-ALA を、光源として安価で広範囲照射の可能な LED を使用し、臨床において重要なグラム陰性菌である MDRP に対する PDT を確立する。

(2) PDT に用いる 5-ALA と Pp の励起波長

天然アミノ酸である 5-ALA に光感受性はないが、細菌内に取り込まれた後、ポルフィリン代謝経路を経て光感受性を示すプロトポルフィリン (Pp) に生合成される。最終的に Pp に Fe^{2+} が配位しヘムとなり、細胞内の様々な酸化還元反応、電子伝達において重

要な役割を果たす。Pp の惹起波長は 410nm に最大のピークがあり、他に 510nm、545nm、580nm、635nm にもピークがある。Pp に励起波長を当てることにより活性酸素が発生し、細菌を死滅させることができる。MDRP に PDT が著効しない理由として、Pp が細菌内に蓄積しにくい、励起波長が細菌内に届きにくい、活性酸素が発生しにくい3点が考えられる。以上の検証により、MDRP に対する PDT を確立することを研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) in vitro

使用菌種、光感受性物質及び光源
緑膿菌 (BAA-2110) を Tryptic Soy Broth (TSB) で培養し使用。光感受性物質は 5-ALA を生理食塩水で目的の濃度に希釈した。光源は、波長 410 nm (青色)、517 nm (緑色)、642 nm (赤色)、及びこれらの波長を混合した白色の LED 光源を使用した。

緑膿菌に対する PDT
 10^5 CFU/ml の緑膿菌を 12 穴のプレートに 0.5cc ずつ入れ、同量の 5-ALA をそれぞれ混合し、最終濃度を 1 mg/ml とした。4 時間暗所で培養後に LED を照射出力 50 J/cm² で照射した。24 時間培養後に菌量を測定した。また、キレート剤であるエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を加え、同様に測定した。また、電子顕微鏡にて菌体を撮影した。

緑膿菌のポルフィリン分析
緑膿菌を 250 μ l の PSB に入れ、超音波でホモジナイズした。酢酸とジメチルホルムアミド、イソプロパノール液を加え遠心分離を行い、高速液体クロマトグラフィーで緑膿菌内のポルフィリン量を分析した。

(2) in vivo

雄の糖尿病マウスを用い、ペントバルビタールナトリウム腹腔内投与にて全身麻酔後、背部を除毛し直径 6mm の皮膚欠損創を作成。その後 10^{10} CFU/ml の緑膿菌を接種し、緑膿菌感染皮膚難治性潰瘍を作成した。24 時間後にマウスの腹腔内に生理食塩水、5-ALA 50 mg/kg もしくは 5-ALA 50mg/kg + EDTA 250 mg/kg を投与し、24 時間後に波長 410 nm の LED を照射出力 50 J/cm² で照射した。連日 PDT を行い、創傷治癒までの期間を計測した。

4. 研究成果

(1) in vitro

緑膿菌内のポルフィリン量

緑膿菌に 5-ALA を投与し、高速液体クロマトグラフィーでポルフィリン類を計測したところ、Pp の比率は約 2%であった。同時に EDTA を添加したところ、Pp の比率は 14%と約 7 倍に増加することがわかった。

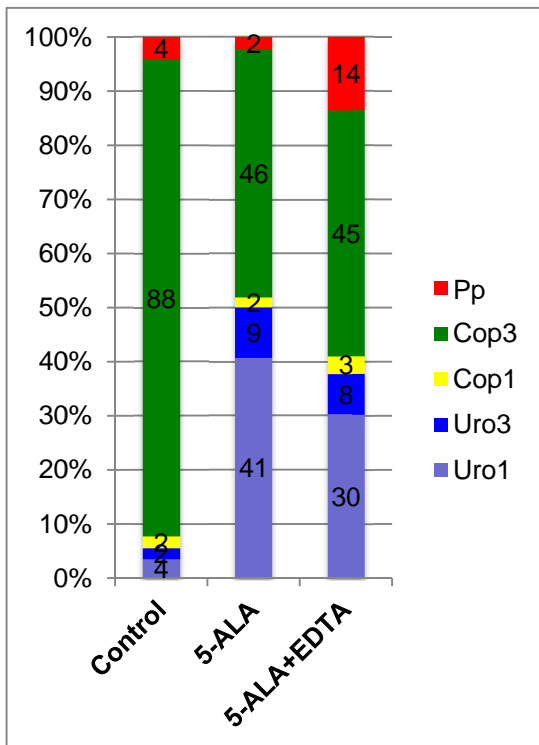


図 1 緑膿菌内のポルフィリン類の比率

緑膿菌に対する PDT

10^5 CFU/ml に調整した緑膿菌と同量の 5-ALA もしくは 5-ALA と EDTA を加え、4 時間暗所で培養後に青色 LED を照射出力 50 J/cm^2 で照射し、24 時間培養後に菌量を測定したところ 5-ALA + EDTA 添加群では有意に菌の増殖を抑制することが出来た。また、波長を緑色、赤色、白色に替え同様に照射したが、いずれも菌の増殖を抑制することは出来なかった。

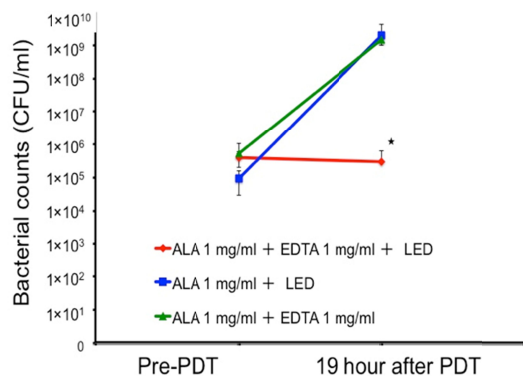


図 2 EDTA を加えた際の PDT の効果

また、電子顕微鏡で菌体を確認したところ、EDTA を加え PDT を行ったものでは細胞壁が破壊されていた。

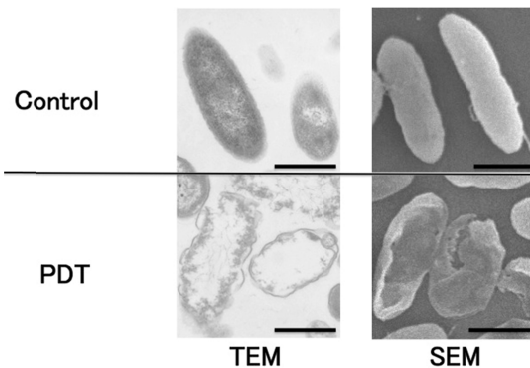


図 3 PDT 後の電子顕微鏡画像

(2) in vivo

糖尿病マウスの背部に緑膿菌感染皮膚潰瘍を作成し、24 時間後にマウスの腹腔内に生理食塩水、5-ALA 50 mg/kg もしくは 5-ALA 50 mg/kg + EDTA 250 mg/kg を投与し、24 時間後に波長 410 nm の LED を照射出力 50 J/cm^2 で照射した。連日 PDT を行い、創傷治癒までの期間を計測した所、13 日間創部を観察したが、創傷治癒を有意に促進することは出来なかった。

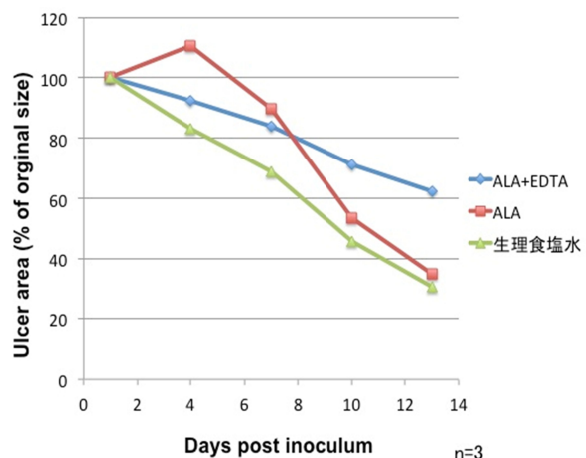


図 4 創面積の経時的変化

今後は、腹腔内投与ではなく、軟膏基剤などの外用剤を用い、研究を進めていく予定である。

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)

[学会発表](計 2 件)

森本訓行、小澤俊幸、坂原大亮、本多典広、粟津邦男、鶴田大輔、Investigation of ALA-PDT for *Pseudomonas aeruginosa*, 第 23 回日本形成外科学会基礎学術集会、2014 年 10 月 9 日~2014 年 10 月 10 日、キッセイ文化ホール(長野県松本市)

森本訓行、小澤俊幸、坂原大亮、本多典
広、粟津邦男、鶴田大輔、緑膿菌に対す
る5-アミノレブリン酸を用いた光線力学
療法、第27回日本レーザー医学会関西地
方会、2014年7月26日、AP大阪駅梅田
1丁目（大阪府大阪市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂原 大亮 (Sakahara Daisuke)
大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院) ・
研究員

研究者番号：30647912