

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791916

研究課題名(和文) 難治性皮膚潰瘍に対する青色LED光を使用した光線力学療法の検討

研究課題名(英文) Photodynamic therapy for intractable ulcer using blue LED

研究代表者

白川 真紀子(Shirakawa, Makiko)

大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・医員

研究者番号：30534630

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：今回の研究で、我々はMRSAに対する5-アミノレブリン酸(5-ALA)と410 nm LEDを用いた光線力学療法(PDT)の効果をin vitroとin vivoで評価した。その結果、410 nm LEDを用いたALA-PDTのMRSAに対するin vitroでの殺菌作用を認めた。in vivoでは、マウスに5-ALAを腹腔内投与することにより、創面のMRSAにPp が蓄積することがわかった。さらにALA-PDTは創傷治癒を促進し、創面の菌量を減少させることがわかった。これにより、ALA-PDTはMRSA感染潰瘍の新しい治療になる可能性がある事が示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we evaluated the effectiveness of photodynamic therapy (PDT) using 5-aminolevulinic acid (5-ALA) and a 410-nm wavelength light emitting diode (LED) in vitro and in vivo for MRSA. We found that ALA-PDT with a 410-nm LED had an in vitro bactericidal effect on MRSA. An in vivo study, we demonstrated that protoporphyrin IX (PpIX) successfully accumulated in MRSA on the ulcer surface after intraperitoneal administration of 5-ALA to mice. Furthermore, we found that ALA-PDT accelerated wound healing and decreased the bacterial count on the ulcer surface. Our findings indicate that ALA-PDT may be a new treatment option for MRSA-infected wounds.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、形成外科学

キーワード：光線力学療法 5-アミノレブリン酸 MRSA

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・新性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)細菌に対する 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 におけるチミジン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.Sci.2004。同様にグラム陰性菌、ウイルス、真菌にも PDT は抗菌効果有するという報告もされている。(Lyon et al, Mycopathologia 2011)

2. 研究の目的

(1)これまでの MRSA 感染皮膚潰瘍に対する PDT

上記のごとく、感染症に対する PDT の有効性の報告は散見される。しかし、MRSA 感染皮膚潰瘍に対する PDT の報告は皆無である。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波長 410nm 青色 LED ライトを使用し(将来的に LED ライトを並列に並べれば、レーザーよりも安価で広範囲照射が可能であるという意味)、MRSA 感染皮膚潰瘍に対する PDT の有用性を検討する。

(2)PDT に用いる 5-ALA と波長 410nm 青色 LED ポルフィリンの前駆物質である 5-ALA に光感受性はないが、腫瘍内もしくは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内因性プロトポルフィリン(Pp)に生合成される。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。悪性腫瘍の PDT に用いる光源としては、Pp の最大のピークの 410nm が最も励起率が高いが、この紫～青色光は血液、メラニン色素に吸収され組織透過性が低いため、現在はエキシマダイレーザー(波長 630nm)が使用されてい

る。

しかし、今回我々の目的は潰瘍面に存在する MRSA 細菌を死滅させ、上皮化を促進することが目的である。逆に、深部にまで到達すると正常組織を障害する可能性がある。そのため、組織深達度が低く Pp の励起率が高い(高エネルギーを必要としない)波長 410nmLED を光源として使用する計画である。

3. 研究の方法

(1) in vitro

410nm 青色 LED 光源の作成

410nmLED はウシオ電機株式会社で購入。共同研究者である大阪大学工学部粟津教授の指導のもとに、数個を並列に連結して PDT の光源を作成する。悪性腫瘍に対する PDT に必要な照射エネルギーは 1 回 50-100J/cm² であるので、その出力を 10 分間で照射できる様に調整する。

細胞毒性試験

正常ヒト上皮細胞および皮膚線維芽細胞を購入し、24 ウェルのシャーレに培養し、細胞毒性試験に使用する。細胞毒性試験としては MTT assay と CytoTox-ONETM Homogeneous Membrane Integrity Assay キットを使用し、ダメージを受けた細胞膜から漏出した乳酸脱水素酵素(LDH)を測定する。これにより、410nmLED の安全性を確認する。

MRSA に対する PDT

MRSA をシャーレにコロニーをカウントできるように培養後、コントロール群、5-ALA 単独投与群、LED 照射単独群、5-ALA および LED 照射群(PDT 群)でのコロニーの増減を調べる。in vitro における 5-ALA の有効濃度と LED 照射出力を検討する。

(2) in vivo

糖尿病マウスの背部に難治性潰瘍を作成雄の糖尿病マウスを使用。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、ラット背部を除毛し直径 6 mm の皮膚欠損創を作成する。その後、 1×10^{10} CFU/ml に調整した MRSA(ATCC No.33591)を接菌し、フィルム材を貼付する

5-ALA の PDT

2 日後、マウスの腹腔内に 5-ALA を投与し、作成した難治性潰瘍部に 410 nm 青色 LED を照射する。PDT を行った群と行っていない群で創傷治癒までの期間および潰瘍部の単位面積あたりの MRSA の菌量を viable plate count で確認する。

4. 研究成果

(1) *in vitro*

細胞毒性試験

正常ヒト上皮細胞および皮膚線維芽細胞に対し、410 nm LED を照射出力 5.20.50 J/cm² で照射したところ、それぞれの細胞から放出される LDH レベルはいずれも低値であり、410 nm LED は細胞毒性がほとんどないことがわかった。

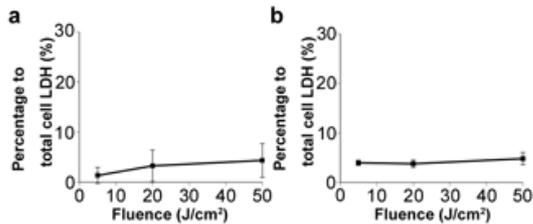


図1 細胞毒性試験

a: 正常ヒト上皮細胞 b: 皮膚線維芽細胞

MRSA に対する PDT

MRSA (ATCC 33591) を 10⁸CFU/ml に調整しておいた。5-ALA は PBS にて溶解し、最終濃度 0.5, 5, 25 mg/ml に調整した。12 穴のプレートに MRSA 菌液と 5-ALA 溶液をそれぞれ 0.5 ml 加え、37 で 4 時間、暗所で接触させた。4 時間後に青色 LED を 5, 20, 50 J/cm² で照射した。照射した菌液を生理食塩水にて 10 段階希釈し、混釈法により生菌数を計測した。その結果、照射出力、5-ALA 濃度とともに依存して殺菌効果を得ることがわかった。5-ALA 濃度 2.5 mg/ml 以上、照射量 50 J/cm² で 4 log₁₀ 以上の MRSA の菌数が減少し、過去の報告と同程度の殺菌効果を認めた。実際の臨床での皮膚癌における ALA-PDT では、5-ALA 濃度は 20% で、照射出力は 50~150 J/cm² でされており、今回の MRSA に対する ALA-PDT の *in vitro* における結果は、それよりも低濃度の 5-ALA で効果を認めており、今後の臨床応用が可能な結果であると考えられる。

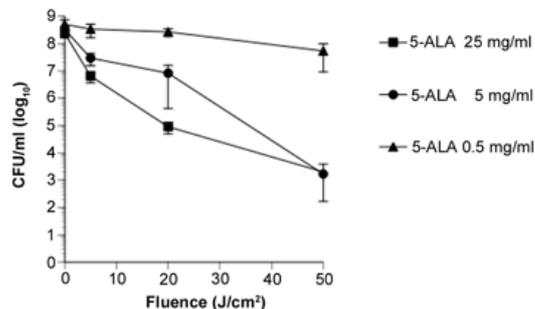


図2 MRSA に対する ALA-PDT

(2) *in vivo*

糖尿病マウスの背部に難治性潰瘍を作成

8~10 週齢の雄糖尿病マウス

(C57BL/ksj/db/db) の背部に直径 6 mm の全

層皮膚欠損創を作成し、創拘縮予防のため、創周囲にシリコンリングを縫着した。その後創面に 10¹⁰ CFU の MRSA を接菌し、フィルム剤で創面を覆った。その後経時的に創部を観察した結果、MRSA を接菌させていないものは、10 日~13 日で完全に創閉鎖したが、MRSA を接菌したものは、13 日目においても創閉鎖せず、表面には膿の付着を認め (Fig. 4) MRSA 感染により創治癒を遅延させるモデルマウスを作成することができた。

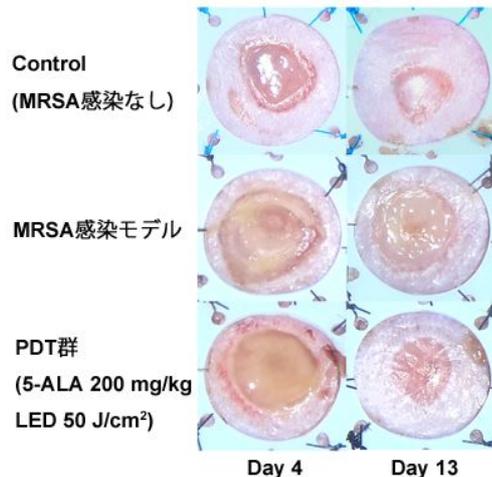


図3 モデルマウスの創部の変化

5-ALA の PDT

モデルマウスに対して、5-ALA 200 mg/kg を腹腔内投与し、24 時間後に青色 LED を照射量 50 J/cm² で創部に照射し PDT を連日行った。また、MRSA に対する代表的な抗生剤であるバンコマイシンを 110 mg/kg、1 日 2 回皮下投与した群と比較した。その結果、ALA-PDT 群では、MRSA を接菌していない創と同程度の 10~13 日程度でほぼ創閉鎖が得られたが、バンコマイシン投与群では、未治療群と同程度の創収縮しか得られなかった。また創部の菌数も ALA-PDT 群では未治療群と比べ 2 log₁₀ 減少した。以上の結果から、5-ALA 全身投与による PDT は、MRSA 感染皮膚潰瘍に対して創治癒を促進し、新たな治療法となる可能性があると思われる。

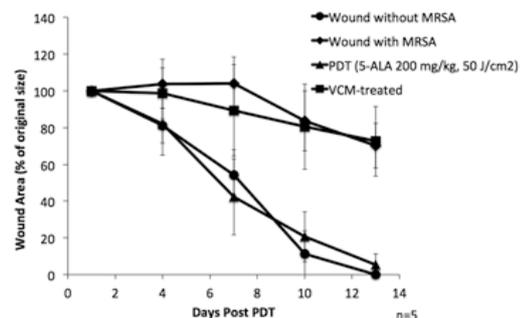


図4 創面積の経時的変化

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4件)

森本訓行、小澤俊幸、白川真紀子、坂原大亮、本多典広、粟津邦男、MRSA 皮膚潰瘍に対する 5-ALA-PDT とバンコマイシン投与との比較、第 43 回日本創傷治癒学会、2013 年 11 月 14 日～2013 年 11 月 15 日、別府

小澤俊幸、森本訓行、白川真紀子、坂原大亮、岩城佳子、本多典広、粟津邦男、MRSA 感染皮膚潰瘍モデルに対する 5-ALA を用いた光線力学療法、第 34 回日本レーザー医学会総会、2013 年 11 月 9 日～2013 年 11 月 10 日、東京

森本訓行、白川真紀子、羽多野隆治、本多典広、粟津邦男、小澤俊幸、青色 LED 光を使用した光線力学療法(PDT)の MRSA に対する殺菌作用の検討、第 42 回日本創傷治癒学会、2012 年 12 月 2 日～2012 年 12 月 4 日、札幌

森本訓行、白川真紀子、藤井奈穂、本多典広、粟津邦男、小澤俊幸、青色 LED 光を使用した光線力学療法(PDT)の MRSA に対する殺菌作用の検討、第 21 回日本形成外科学会基礎学術集会、2012 年 10 月 4 日～2012 年 10 月 5 日、福島

6. 研究組織

(1)研究代表者

白川 真紀子 (Shirakawa, Makiko)

大阪市立大学医学研究科 医員

研究者番号：30534630