

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11584

研究課題名(和文) 緑膿菌に対するバイオフィーム低減と光感受性物質増加を目指した光線力学療法

研究課題名(英文) The photodynamics therapy aiming at biofilm reduction for *Pseudomonas aeruginosa* and photosensory material increase

研究代表者

小澤 俊幸 (OZAWA, TOSHIYUKI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：50570602

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの我々の光線力学療法の条件と同様に、緑膿菌感染皮膚潰瘍に対して0.5%アミノレブリン酸を親水軟膏に溶解し、410nmLEDを9J/cm²でPDTを行ったが、創傷治癒は促進しなかった。この理由は、緑膿菌のバイオフィーム量が多いことが1つの原因と考えた。この問題の解決のため、キレート剤の同時投与が必要と考え、最適なものはEDTA-2Naであることを解明した。予想通り、バイオフィームの産生量は、1/7となった。マウス背部緑膿菌感染皮膚潰瘍に対して、0.5%ALA、0.05%EDTA-2Naを親水軟膏に溶解し、410nmLEDを9J/cm²照射したところ、創傷治癒も促進することもわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、MRSAや緑膿菌感染皮膚潰瘍に対する治療法は、蜂窩織炎などを合併する場合は抗生剤投与、その他の場合は消毒殺菌剤を患部に塗布し洗浄処置であった。抗生剤の投与は、新たな耐性菌を生じ、消毒殺菌剤は、創傷治癒を遅延することが知られている。我々は、この2つの問題を同時に解決する一つとして、光線力学療法に注目し研究を行っている。今回の研究を合わせて、光線力学療法が、MRSAおよび緑膿菌、つまり、グラム陽性菌およびグラム陰性菌両方に殺菌効果及び創傷治癒促進効果があることがわかった。つまり、光線力学療法は感染皮膚潰瘍に対する新たな治療方の1つになりえる可能性があることがわかった。

研究成果の概要(英文)： Photodynamic therapy (PDT) is thought to have the potential to be a non-antibiotic treatment for infections. 5-Aminolevulinic acid (ALA), which works as a photosensitizer after being metabolized into protoporphyrin IX (PpIX) in the heme synthetic pathway, is used for PDT. Thus far, the in vivo effectiveness of PDT using ALA against *Pseudomonas aeruginosa* (PA) is unknown. Objective: In this study, we investigated PDT using ALA both in vitro and in vivo. Although PDT with ALA alone did not show a bactericidal effect on PA, PDT with both ALA and EDTA-2Na had a bactericidal effect in vitro and reduce the biofilms. In in vivo experiments, wounds healed faster in PA-infected mice treated with PDT using both EDTA-2Na and ALA compared to non-PDT. These results suggest that PDT with EDTA-2Na and ALA is a potential novel treatment option for PA-infected wounds.

研究分野：皮膚科

キーワード：アミノレブリン酸 皮膚潰瘍 バイオフィーム 緑膿菌 光線力学療法

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗生物質の乱用により、多剤耐性菌が出現し、人類は新たな細菌の脅威に晒されている。今後、既存の耐性菌にも有効で、新たな耐性菌も出現させない夢のような抗生物質の開発が期待される。しかし、実際には、抗生物質に頼らない全く新しい感染症治療法の実現が必要不可欠であると考えられる。

その新たな治療法の一つとして、Photodynamic therapy (PDT)がある。PDTとは、生体に光感受性物質(Ps)を静脈注射または塗布し、標的となる組織もしくは細菌に取り込ませる。その後、特定の波長の光を標的に照射することにより標的内に活性酸素を生じさせ、癌や感染症などの病巣を治療する治療方法全般を示す。特に、細菌に対するPDTは、殺菌に活性酸素を利用するため、新たな耐性菌を生じないという利点を有する。

Psは数多く存在するが、我々は、5-aminolevulinic acid(ALA)を使用してPDTを行っている。細菌におけるALAの取り込み経路、代謝経路の全容は未だ解明されていないが、取り込まれたALAは、細菌に内在するALAと同様の代謝経路によりプロトポルフィリンIX(PpIX)に生合成され、このPpIXがPsとして作用する。一方、PDTに使用する光源の波長は、使用するPsの励起波長により決定される。我々は、安価で広範囲の照射が容易であり、PpIXに対する励起効率が最大である波長410nmLEDの光源を研究に使用している。

2. 研究の目的

グラム陰性菌がグラム陽性菌と比較し、Psを取り込みにくく、殺菌効果を得ることが難しいことが考えられる。Psの取り込みが少ない理由として、グラム陽性菌とグラム陰性菌の膜構造の違い、薬剤排泄ポンプ、バイオフィルムの存在が報告されている。特に临床上、グラム陰性菌で問題となるPseudomonas aeruginosa(PA)は、多剤排出ポンプを有し、バイオフィルムの産生も多いため、PDTによる殺菌効果を得ることが難しいと考えられていた。一方、臨床においても、PA感染症は抗生剤を用いた治療でも難治することは周知の事実である。

そのため、我々は、新たな耐性菌を出現させないPDTを用いて、難治性のPA感染皮膚潰瘍のPAの殺菌と創傷治癒促進ができれば、耐性菌出現の可能性を大きく減少できるのではと考え研究を行ってきた。

そして、今回我々は、この治療に難治するPA感染皮膚潰瘍に対して、EDTA-2Naを加えたALAと410nmLEDを使用してPDTを行い、バイオフィルムの減少を伴い、殺菌および創傷治癒促進効果が確認できたので報告する。

3. 研究の方法

▼グラム陰性菌に対するPDTの際のキレート剤の効果

グラム陰性菌である緑膿菌は、薬剤分解酵素、薬剤排出ポンプ、バイオフィルム存在により、抗生物質に対する耐性を獲得しやすい。同様の理由で、これまでPDTでは殺菌は難しいとされてきた(Photochem Photobiol. 1992)。緑膿菌をPDTで殺菌するために、我々は細菌内でPpIXがへムに代謝されるにはFe²⁺が必要であることに注目し、Fe²⁺を取り除けばPpIXがへムに代謝されず細菌内に蓄積するのではないという仮説を立てALA-PDTの研究を行ってきた。結果、in vitroではALAにキレート剤であるEDTA-Caを添加することによりPpIXの産生量が10倍となり、410nmLEDを照射することにより殺菌効果を得ることができた(科研費25861694, 26462762. 特許出願PCT/JP2014/065813)(Fig 1)。しかし、最終目標であったin vivoでの創傷治癒促進効果は見られず、さらなる研究が必要となった。

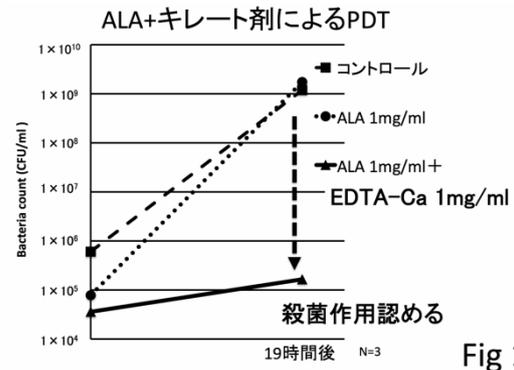
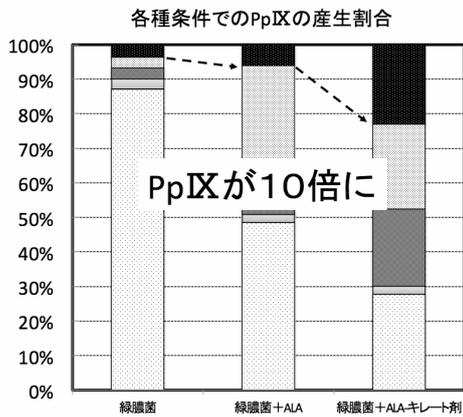


Fig 1

▼ 緑膿菌感染皮膚潰瘍モデルで ALA&EDTA-Ca-PDT が創傷治癒効果を示さなかった原因

緑膿菌感染皮膚潰瘍には EDTA-Ca を添加する工夫をおこなったにもかかわらず、創傷治癒促進効果が見られなかった。そこで原因を再度検討したところ、緑膿菌潰瘍表面には多量のバイオフィームが存在することに気づいた。

▼ MRSA と緑膿菌のバイオフィームの産生量の比較

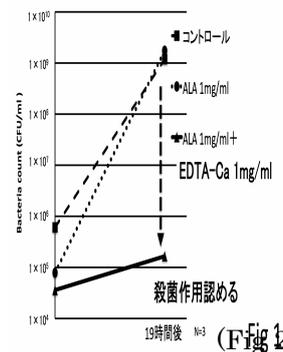
上記の理由により、in vitro で同数に調整した MRSA と緑膿菌のバイオフィームの量をクリスタルバイオレット法で測定したところ、緑膿菌は MRSA と比較し約 17 倍のバイオフィームを産生することがわかった (Fig 2)。

▼ バイオフィームと Ca²⁺

上記のごとく、バイオフィームの量が PDT 効果に重要であるとすれば、バイオフィーム産生量を減少させる必要が生じた。Banin E は、バイオフィームの産生には Ca²⁺が必要であると報告していた (AEM, 2006)。しかし、我々が使用していたキレート剤である EDTA-Ca は、Ca²⁺を含むため、再度キレート剤の選択の必要性が生じた。

候補としては、EDTA-Na、リンゴ酸、クエン酸以外にはエチドロン酸 4Na、Diethylenetriamine pentaacetic acid、Triethylenetetramine hexaacetic acid、N-(2-Hydroxyethyl) iminodiacetic acid、Deferoxamine mesilate salt を考えた。

ALA+キレート剤によるPDT



(Fig 1)

4. 研究成果

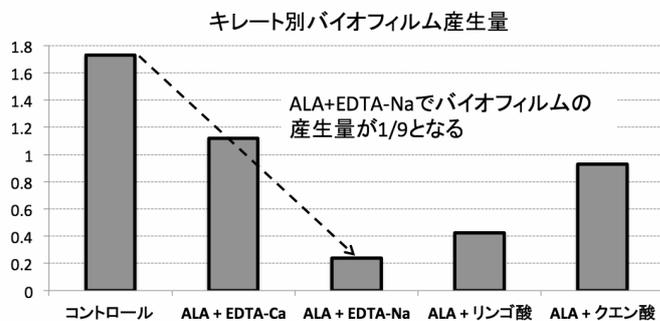
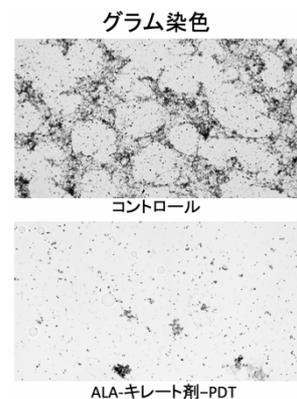


Fig 3



バイオフィーム産生量測定および形態の比較

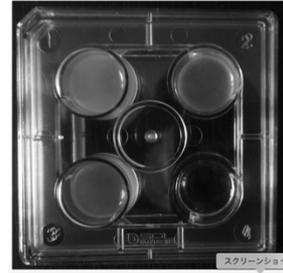
クリスタルバイオレット法で、バイオフィームを測定すると、PDT 前後のグラム染色から、バ

イオフィルムの形態的变化が、蜂巢状のバイオフィルムが消失していることがわかった。また、最もバイオフィルムを減少させたキレート剤は EDTA-Na であることがわかった (Fig 3)。

ALA+EDTA-2Na による緑膿菌に対する PDT

1×10^5 CFU/ml の緑膿菌に対して、0.5%ALA および 0.05%EDTA を加え 410nmLED を 10 J/cm^2 を照射した結果、有意に緑膿菌量は減少した。

1×10^5 CFU/ml の緑膿菌に対して PDT 24時間後



Control	ALA 5 mg/mL + EDTA-2Na 0.05 mg/mL
ALA 5 mg/mL + 410 nm LED	ALA 5 mg/mL + EDTA-2Na 0.05 mg/mL + 410 nm LED

Fig 4

マウス背部皮膚潰瘍に対して 1×10^6 CFU の緑膿菌を接種し、感染皮膚潰瘍を作成。各条件での上皮化の変化

感染していない潰瘍 (A)。潰瘍に 1×10^6 CFU の緑膿菌を感染させた潰瘍 (B) 感染潰瘍に対して、タゾバクタム・ピペラシリンを連日投与した場合の皮膚潰瘍 (C) 感染潰瘍に対して 0.5%ALA および 0.05%EDTA を親水軟膏に溶解したものを塗布、410nmLED を 9 J/cm^2 で照射し、PDT を連日行った潰瘍 (D) (Fig 5)。

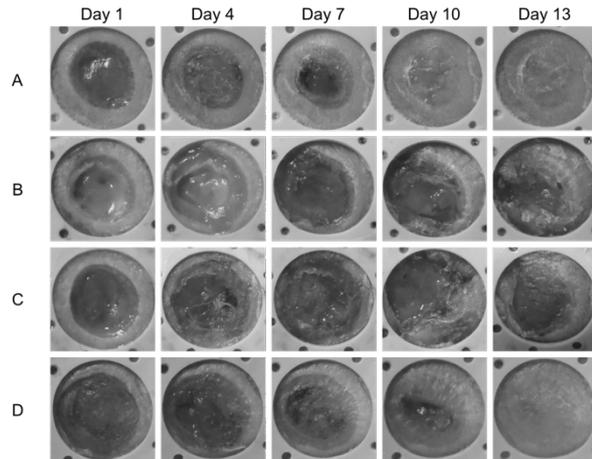


Fig 5

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 小澤 俊幸	4. 巻 127
2. 論文標題 2. 光線過敏を使用した皮膚科治療：PDT	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本皮膚科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 2791～2797
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14924/dermatol.127.2791	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Katayama Bunpei, Ozawa Toshiyuki, Morimoto Kuniyuki, Awazu Kunio, Ito Nobuhisa, Honda Norihiro, Oiso Naoki, Tsuruta Daisuke	4. 巻 90
2. 論文標題 Enhanced sterilization and healing of cutaneous pseudomonas infection using 5-aminolevulinic acid as a photosensitizer with 410-nm LED light	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 323～331
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jderm.2018.03.001	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nakai Yasushi, Ozawa Toshiyuki, Mizuno Fumiko, Onishi Sayuri, Owari Takuya, Hori Syunta, Morizawa Yosuke, Tatsumi Yoshihiro, Miyake Makito, Tanaka Nobumichi, Tsuruta Daisuke, Fujimoto Kiyohide	4. 巻 143
2. 論文標題 Spectrophotometric photodynamic detection involving extracorporeal treatment with hexaminolevulinate for bladder cancer cells in voided urine	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Cancer Research and Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 2309～2316
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00432-017-2476-5	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Bumpei Katayama, Toshiyuki Ozawa, Sakiko kuzuya, Nobuhisa Ito, Kunio Awazu, Daisuke Tsuruta
2. 発表標題 Photodynamic therapy against both methicillin-resistant Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa
3. 学会等名 International Investigative Dermatology（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小澤俊幸
2. 発表標題 光・レーザーが皮膚に与える影響・障害
3. 学会等名 レーザー学会学術講演会第37回年次大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	粟津 邦男 (AWAZU KUNIO) (30324817)	大阪大学・工学研究科・教授 (14401)	
研究分担者	鶴田 大輔 (TSURUTA DAISUKE) (90382043)	大阪市立大学・大学院医学研究科・教授 (24402)	