

令和 5 年 5 月 15 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18343

研究課題名(和文)光化学反応を用いた角膜感染症治療

研究課題名(英文)New treatment for infectious keratitis with photochemical reaction

研究代表者

末岡 健太郎 (Sueoka, Kentaro)

広島大学・医系科学研究科(医)・寄附講座助教

研究者番号：20868228

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：光線力学的抗微生物化学療法(photochemical antimicrobial chemotherapy: PACT)による新規角膜感染症治療の確立が究極の目的である。

研究期間中に、新規のパルス照射モード付き半導体レーザー(laser diode)の安定した光特性を確認し、光源として一貫して使用した。塩化ベンザルコニウム(BAC)、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)の添加によるPACTの相乗効果を確認し、菌種により望ましい補助薬剤が異なった。角膜感染家兎へのBAC添加PACTを検討したが、未だ有効性は確認できていない。汎用性、拡張性としてコンタクトレンズ消毒を検討し、一部菌種で有効だった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本治療法が確立すれば、薬剤耐性菌や特異的治療法がないアcantアメーバを原因とする角膜感染症に対しても早期から対処でき、治療期間の短縮、視機能維持、医療費の削減にも大きく貢献することになる。抗微生物薬と全く異なる物理的抗菌技術であるPACTは、繰り返しの治療による耐性化獲得の報告もなく、抗微生物薬の使用を減らすことで新たな薬剤耐性(AMR)病原微生物の出現抑制につながる。医療環境の整備が遅れている発展途上国や、起炎病原体の即時同定が困難なクリニックにおいても、角膜感染症のファーストタッチ治療としての発展も期待できる。本研究の進展により角膜感染症治療のパラダイムが大きく転換する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The ultimate goal of this study is to establish a novel treatment for infectious keratitis using photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT).

During this study period, the stable optical characteristics of a newly prepared semiconductor laser diode with pulsed irradiation mode were confirmed and used consistently as a light source. The synergistic effect of PACT with the addition of the surfactant benzalkonium chloride (BAC) or the chelating agent ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) was confirmed, and the desired auxiliary agent differed depending on the bacterial species. PACT with the addition of BAC to rabbit *S. aureus* keratitis model was investigated, but its efficacy has not yet been confirmed. The efficacy of PACT in contact lens disinfection was examined for versatility and extensibility, and was effective for some species of bacteria.

研究分野：眼形成外科、眼瞼・眼窩・涙道疾患、眼感染症

キーワード：光線力学的抗微生物化学療法 PACT 抗菌PDT 角膜感染症 薬剤耐性 新規角膜感染症治療 半導体レーザー(Laser Diode) パルス照射

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

角膜感染症は、糖尿病などの基礎疾患を有する人だけでなく、健常な角膜に対しての不適切なコンタクトレンズ使用やレーシック術後などにも生じる。早期治療で角膜の混濁や変形を最小限にとどめることが視機能の維持につながる。しかしながら、起炎病原体は多岐にわたり、混合感染例や、いまだ特異的治療がないアcantアメーバ例、さらに近年、抗微生物薬の濫用による薬剤耐性 (antimicrobial resistance : AMR) 病原微生物も増加しており、診断・治療に苦慮することが少なくない。

光線力学的療法 (photodynamic therapy : PDT) は、標的細胞に特異的に集積する光感受性物質に対して、特定波長の光を照射することで活性酸素種、とくに一重項酸素を発生させる。そして、その強い殺細胞性で癌細胞や新生血管を破壊、退縮させる治療法である。種々の癌治療や眼科領域では加齢黄斑変性の治療に臨床応用されている。近年、AMR 増加に対する懸念が世界的に広がりを見せており、抗微生物薬に頼らない抗菌 PDT である光線力学的抗微生物化学療法 (photodynamic antimicrobial chemotherapy : PACT) が注目され、臨床応用に向け各領域で研究が行われている。歯科領域では、歯周病に対してメチレンブルーを用いた PACT がすでに臨床応用されているが、医科領域ではまだ臨床応用されておらず、さらに眼科領域では基礎実験を含めた PACT の報告はごくわずかのみである。

抗微生物薬と全く異なる物理的抗菌技術である PACT は、繰り返しの治療による耐性化獲得の報告もなく、新たな薬剤耐性菌を生み出さないためにも、PACT は非常に期待される感染症治療である。PACT に用いる薬剤は安価で、複雑な装置を必要としないため、医療費削減とともに医療環境の整備が遅れている発展途上国においても角膜感染症の初期治療として発展が期待できる。本研究の進展により角膜感染症治療のパラダイムが大きく転換する可能性がある。

2. 研究の目的

本研究は、PACT を用いた抗微生物薬に頼らない新たな角膜感染症治療法の確立が究極の目的である。

我々はこれまでに、新規光感受性物質であるカチオン性クロリン誘導体 TONS504 を用いた PACT で、角膜感染症の起炎各種病原体 (細菌、真菌、ウイルス、原虫) に対する有効性を *in vitro* で示してきた。また、現在確実な治療法のないアcantアメーバ角膜炎に対する有効性も *in vivo* で示した。

高濃度の光感受性物質、高エネルギーの光照射といった強い条件の PACT は高い抗微生物効果を示すが、それに伴い正常組織に対する傷害性が懸念される。今回の研究では、光感受性物質の種類や濃度、補助薬剤、照射する光の種類や照射法など、どのような PACT 条件がより高い抗微生物効果を発揮し、さらに正常組織への影響を回避できるかを見出すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 新規光照射装置と従来型光照射装置の比較検討

我々のこれまでの研究では、TONS504 の最大励起波長である 660nm にピークを有する連続照射の発光ダイオード (light emission diode : LED) を光源とする光照射装置 (ME-PT-DSRD660-0201、CCS 株式会社) を用いてきた。いままで、良好な抗微生物効果を明らかにしてきたが、連続照射による温度上昇を避けるために一定時間の照射休止間隔を要した。さらに LED 光は照射距離による光強度の変化が大きいためという欠点がある。そこで今回、新たな光源として波長 665nm、最大出力 0.78W、照射面積 20×20mm ~ 40×40mm のパルス照射モード付き半導体レーザー (laser diode : LD) 装置 (PCTH195、株式会社 UNITAC) を準備し、従来の LED 装置と比較検討した。

以下の実験では、すべて新型の LD 光照射装置を用いた。

(2) 補助薬剤による PACT 抗微生物効果の増強作用

我々のこれまで研究での、界面活性剤 (Triton X-100) 添加によって TONS504-PACT の $^{10}_2$ 生成量が増加したことを受け、界面活性剤である塩化ベンザルコニウム (benzalkonium chloride : BAC) およびキレート剤であるエチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid : EDTA) 添加による *S. aureus*、*P. aeruginosa*、*C. albicans* に対する TONS504-PACT の抗微生物効果の増強をみた。

(3) コンタクトレンズ (CL) 消毒効果

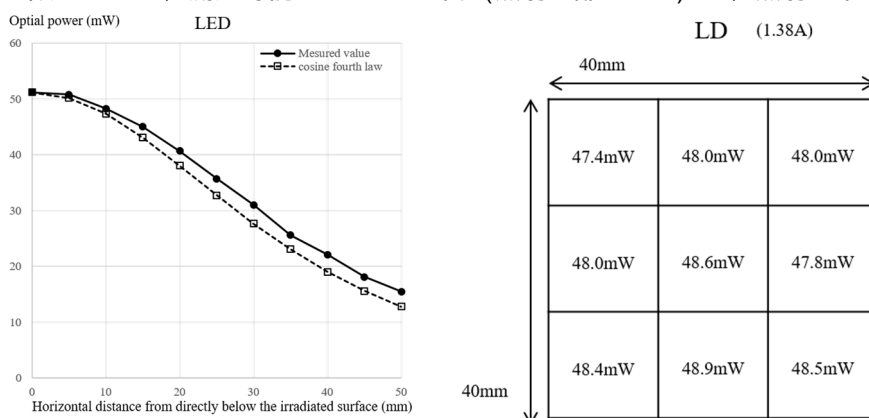
CL 上での *S. aureus* および *P. aeruginosa* に対する TONS504-PACT の有効性を、液中での抗微生物効果と比較検討した。

4. 研究成果

(1) 新規光照射装置と従来型光照射装置の比較検討

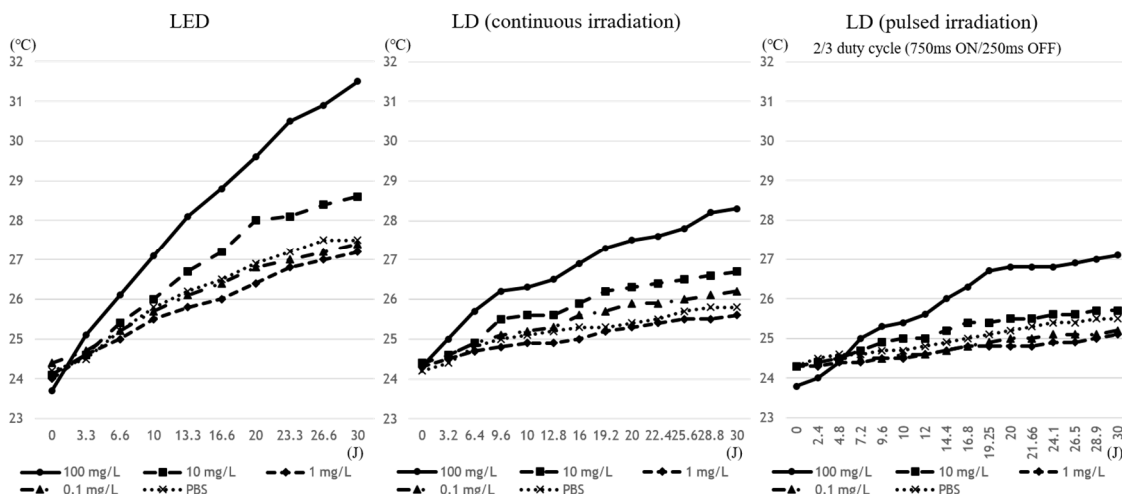
光照射強度

いずれの照射装置においても、光照射強度は照射距離の二乗に反比例した（距離の逆2乗則）。光が発散するLEDでは、光源から垂直な照度（直下照度 E_0 ）に対して、角度 方向の照度（ E ）は \cos^4 倍に減弱した（コサイン4乗則）。一方、LDは直進性が非常に高いため測定可能範囲が限られるが、測定可能な $40 \times 40\text{mm}$ 内（照射距離 327mm ）で、照射直下と変わりはなかった。



温度上昇への影響

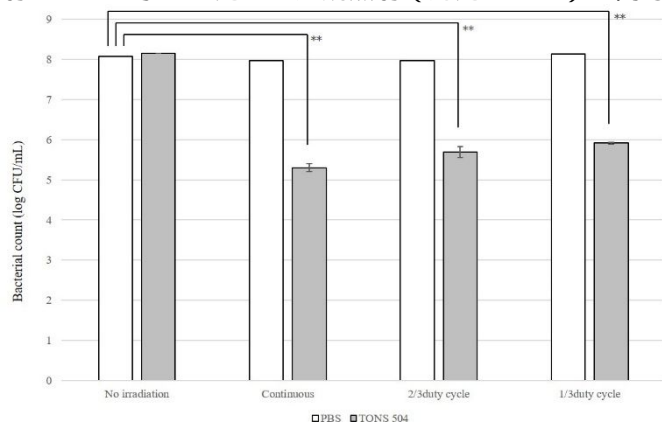
いずれの照射装置、照射モードにおいても、TON504 濃度に応じた温度上昇があり、LED（連続照射のみ）> LD 連続照射 > LD パルス照射の順で温度上昇が高かった。



照射装置、照射モードによる抗微生物効果の違い

S. aureus に対して、LED 連続照射（30J）LD 連続照射（30J）いずれも TONS504 濃度に応じた抗微生物効果を示し、抗微生物効果に差はなかった。

LD 照射法（連続照射とパルス照射）による TNOS54-PACT 抗微生物効果に有意差はなかったが、パルス照射では 2/3 duty cycle で 20J、1/3 duty cycle で 10J の総光量であるため、パルス照射ではより小さな光量で連続照射（総光量 30J）と同等の抗微生物効果を示すことがわかった。

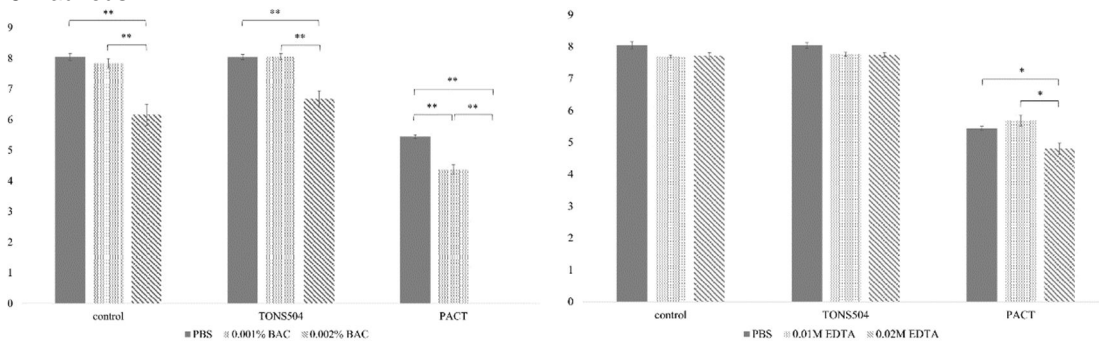


(2) 補助薬剤による PACT 抗微生物効果の増強作用

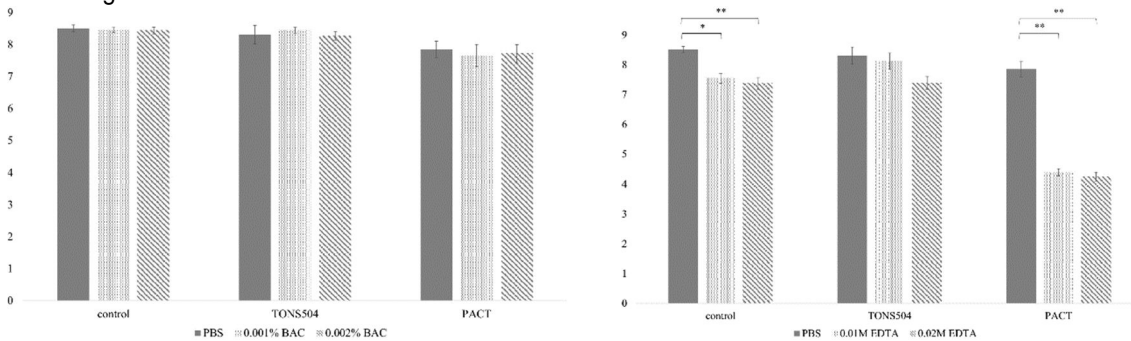
S. aureus に対しては BAC、EDTA と相乗効果があり（BACの方が顕著）、*P. aeruginosa* に対し

では EDTA のみ、*C. albicans* に対しては BAC のみ相乗効果があった。BAC は菌の膜安定性を低下させ、かつ TONS504 の会合を抑制することで、EDTA は外膜の浸透性を上げることで PACT の抗微生物効果が増強されたと考えられ、菌種によって望ましい補助薬剤が異なることがわかった。

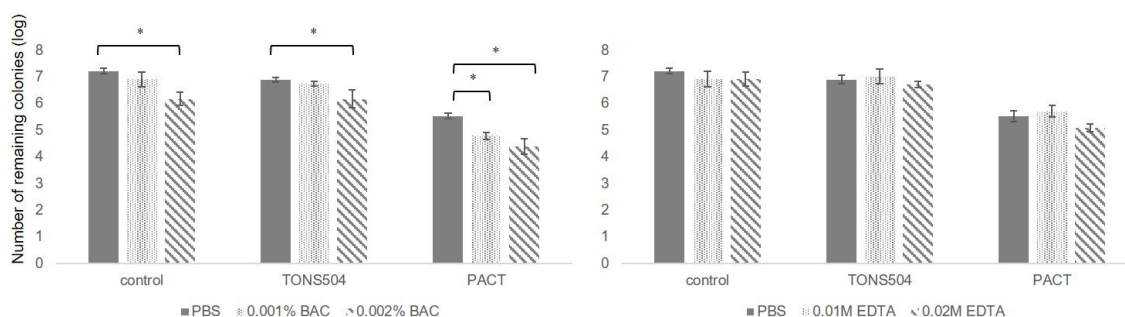
S. aureus



P. aeruginosa



C. albicans

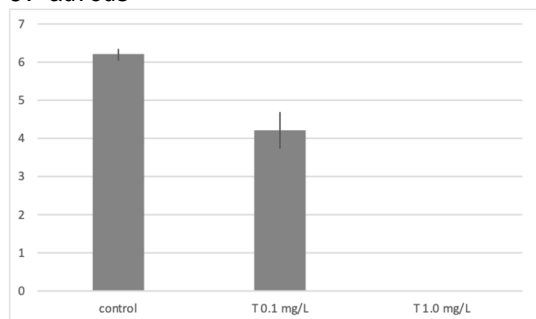


家兎黄色ブドウ球菌角膜感染モデルを作製し、BAC (0.02%) 添加 TONS504-PACT の効果を検討したが、in vivo においては未だ有効性は確認できていない。

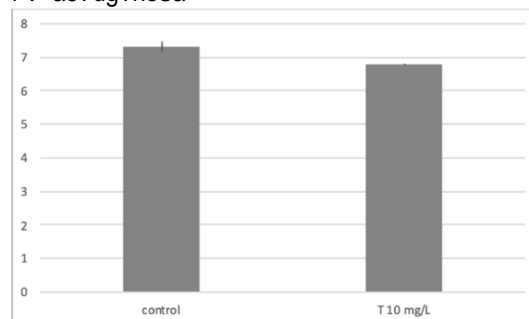
(3) コンタクトレンズ (CL) 消毒効果

S. aureus に対しては CL 上においても有効だった。一方、*P. aeruginosa* に対しては CL 上では抗微生物効果はなかった。

S. aureus



P. aeruginosa



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Shinji Koichiro, Chikama Taiichiro, Okazaki Shigetoshi, Sueoka Kentaro, Ko Ji-Ae, Kiuchi Yoshiaki, Sakaguchi Takemasa	4. 巻 21
2. 論文標題 Synergistic effect of TONS504-mediated photodynamic antimicrobial chemotherapy and additives widely contained in ophthalmic solutions: benzalkonium chloride and ethylenediaminetetraacetic acid	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Photochemical & Photobiological Sciences	6. 最初と最後の頁 1895 ~ 1905
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s43630-022-00266-4	査読の有無 有
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 Shinji Koichiro, Chikama Taiichiro, Okazaki Shigetoshi, Uto Yoshihiro, Sueoka Kentaro, Pertiwi Yuniathy Dwia, Ko Ji-Ae, Kiuchi Yoshiaki, Sakaguchi Takemasa	4. 巻 221
2. 論文標題 Molecular characteristics of the photosensitizer TONS504: Comparison of its singlet oxygen quantum yields and photodynamic antimicrobial effect with those of methylene blue	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology	6. 最初と最後の頁 112239 ~ 112239
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphotobiol.2021.112239	査読の有無 有
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 Dwia Pertiwi Yuniathy, Chikama Taiichiro, Sueoka Kentaro, Ko Ji Ae, Kiuchi Yoshiaki, Onodera Makoto, Sakaguchi Takemasa	4. 巻 -
2. 論文標題 Efficacy of Photodynamic Anti Microbial Chemotherapy for Acanthamoeba Keratitis In Vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Lasers in Surgery and Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/lsm.23355	査読の有無 有
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10件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Shinji K, Chikama T, Sueoka K, Kiuchi Y
2. 発表標題 Benzalkonium Chloride and Ethylenediaminetetraacetic Acid Enhance the Photodynamic Antimicrobial Effect
3. 学会等名 ISER2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 近間泰一郎
2. 発表標題 角膜感染症に対する光線力学的抗微生物化学療法 (PACT) の臨床効用
3. 学会等名 第32回日本光線力学学会学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 穴道紘一郎、近間泰一郎、木内良明
2. 発表標題 界面活性剤およびキレート剤添加による光線力学的抗微生物効果の増強
3. 学会等名 第24回眼創傷治癒研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 穴道紘一郎、近間泰一郎、末岡健太郎、木内良明
2. 発表標題 グラム陰性菌と酵母真菌に対する界面活性剤添加光線力学的抗微生物化学療法
3. 学会等名 フォーサム2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 穴道紘一郎、近間泰一郎、末岡健太郎、木内良明
2. 発表標題 界面活性剤による光線力学的抗微生物効果への影響
3. 学会等名 角膜カンファランス2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 末岡健太郎、宍道紘一郎、近間泰一郎、木内良明
2. 発表標題 PACTにおけるレーザーパルス照射の有用性
3. 学会等名 第31回日本光線力学学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宍道紘一郎、近間泰一郎、岡崎茂俊、末岡健太郎、木内良明
2. 発表標題 TONS504とメチレンブルーの一重項酸素生成収率およびC. albicansに対する光線力学的抗微生物効果の比較
3. 学会等名 第31回日本光線力学学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 近間泰一郎、Pertiwi YD、末岡健太郎、宍道紘一郎、木内良明、高知愛、坂口剛正
2. 発表標題 アcantアメラバ角膜炎に対する光線力学的抗微生物化学療法の有効性と安全性
3. 学会等名 第125回日本眼科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宍道紘一郎、近間泰一郎、末岡健太郎、Pertiwi YD、坂口剛正、木内良明、尾花明
2. 発表標題 光感受性物質TONS504とメチレンブルーの光線力学的抗微生物効果の比較
3. 学会等名 角膜カンファランス2021 (真鍋賞 受賞)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宍道紘一郎、近間泰一郎、末岡健太郎、Pertiwi YD、坂口剛正、木内良明、尾花明
2. 発表標題 TONS504とメチレンブルーのS. aureus とP. aeruginosa に対する光線力学的抗微生物効果の比較
3. 学会等名 第30回日本光線力学学会学術講演会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------