

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：32717

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12715

研究課題名（和文）黄色ブドウ球菌に対する光線力学的不活化のための内在性光増感性物質の解明

研究課題名（英文）Study of intrinsic photosensitizers for photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus*

研究代表者

徳岡 由一（Tokuoka, Yoshikazu）

桐蔭横浜大学・医用工学部・教授

研究者番号：30339907

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）：外因性光増感剤を添加することなく白色LED光照射に伴う*S. aureus*の光不活化効果の作用機序の解明を目的に、*S. aureus*内因性光増感剤の探索を行った。一連の研究結果から、内因性光増感剤は*S. aureus*菌株に関わらず普遍的に存在し、*S. aureus*が産生する黄色色素であるSTXとは直接関与しない化合物であることが示唆された。また、その化合物は化学構造中アルケン構造を有していることが確認されたが、化合物の同定までには至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗菌薬が効かない薬剤耐性菌の急激な増加が世界的に問題視されている中で、本研究成果は、多様な感染症の原因菌となる*S. aureus*に対して、抗菌薬に依存しない新たな治療戦略を考える上で有用な知見を提供する。また、新たな光増感剤の探索のトリガーとなり、細菌感染症のみならず、癌などの光線力学的療法の効果向上につながるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：A search for *S. aureus* intrinsic photosensitizer (PS) was investigated to elucidate the mechanism of action of the photodynamic inactivation effect on only the white LED light irradiation in *S. aureus*. The results of a series of studies suggest that the intrinsic PS is a compound that is generally present regardless of the *S. aureus* strain and is not directly related to staphyloxanthin that is the yellow pigment produced by *S. aureus*. The PS was also identified as having an alkene structure in its chemical structure. However, the compound could not be identified.

研究分野：光治療学 / コロイド化学 / 生体材料 / 薬物送達システム

キーワード：黄色ブドウ球菌 光不活化 白色LED光 スタフィロキサンチン 一重項酸素

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。

1. 研究開始当初の背景

現代医療において悪性新生物（癌）および感染症は医療経済を圧迫する疾病の一つである。癌に対する治療には、現在でも多くのオプションが存在し、その一つに光線力学療法(Photodynamic therapy: PDT)がある。PDTの作用機序は、腫瘍細胞に選択的集積性のある光増感性物質(Photosensitizer: PS)を体外から投与して病変部に選択的に集積させ、特定波長の可視光線を照射することでPSの光増感作用によって生じる活性酸素種(Reactive oxygen species: ROS)が殺細胞効果を示すことによる。PDTの臨床応用は、癌治療の分野で急速に進んでおり、これまでも胃癌、肺癌、食道癌、子宮頸癌、悪性脳腫瘍などに新たなPSと光源による治療方法が次々と適応されている。

一方、感染症に対する治療は抗菌薬に頼ることがほとんどで、他の有用な抗菌方法は臨床的には見当たらない。しかし、現在、抗菌薬が効かない薬剤耐性菌の急激な増加が世界的な問題の一つとなっている。さらに、薬剤耐性菌の治療に使用した抗菌薬が新たな耐性菌を生んでしまう悪循環のため、新規抗菌薬の開発は進んでこなかった。それに対し、世界的な取り組みとして感染症に対する新たな治療選択として、新規抗菌性物質の探索や新規治療法の確立が盛んに叫ばれている。そこで、癌に対するPDTと同様に、細菌の光不活化(Photodynamic inactivation: PDI)が確立されれば感染症に対する新たな治療戦略のためのオプションの拡大が期待される。

我々はこれまで、感染症に対する新たな取り組みとして、PSの前駆体である5-アミノレブリン酸(5-Aminolevulinic acid: ALA)およびその誘導体と赤色光を用いて、尋常性ざ瘡(ニキビ)の原因となるアクネ菌(*Propionibacterium acnes*: *P. acnes*)に対するPDIを行い、その有用性を確認した¹⁾。また、外因性PSを用いず可視光線のみを照射することで生じる光線力学的作用による細菌のPDI(nPS-PDI)についても研究を行い、例えば、ニキビ患者に対する赤色光によるnPS-PDIが臨床的に有効で、皮膚表面の*P. acnes*を含む常在性菌を減少させることを見出した²⁾。さらに、皮膚軟部組織を含む多彩な感染症の原因となる黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*: *S. aureus*)に対して、外因性PSを用いずに白色LED光線を照射することで殺細胞効果があることを確認し、照射エネルギーの増加に伴い、その効果が増加することを報告している。

*P. acnes*および*S. aureus*に対するnPS-PDIは、外因性のPSを用いていないことから、殺細胞効果に繋がる作用機序の予想が困難である。しかし、細菌の代謝産物に内因性PSが存在することが強く示唆され、このPSの同定はnPS-PDIの作用機序を明らかにするためにも重要となる。

2. 研究の目的

そこで本研究では、多彩な感染症の原因となる*S. aureus*に注目し、nPS-PDI効果の作用機序解明の一環として、nPS-PDI効果発現に寄与する細菌細胞由来PS候補物質を分離分析して特定し、光化学反応によって生じるROSの同定・定量をすることを目的とした。nPS-PDIの作用機序の解明は臨床応用を考える上で必要不可欠であり、細菌由来の新たなPSの発見は細菌や癌組織の光刺激に対する生存戦略に新たな知見を提供すると考える。

3. 研究の方法

(1) 異なる*S. aureus*株から抽出した抽出成分による活性酸素種生成

被験菌株としてATCC29213、N315、N315 Δ sigB、8325-4およびSH1000の5株を用いた。各菌株はTrypticase Soy Broth 150mLに接種し、37°C、130rpmで一晩振盪培養した。増菌した被験菌株は、遠心集菌後、99.5%エタノールに浮遊させ、超音波洗浄機で40°C、20分間インキュベート後、4°C、3400rpm、15分遠心した上清を分取し抽出液とした。抽出液からの成分分画にはODSカラムを設置したHPLC(La Chrom System、HITACHI社製)を用いた。分画条件は、流速0.7mL/min、カラム温度40°Cとし、溶離液には水:エタノール=1:9を用いた。また、検出器には紫外-可視検出器(検出波長:450nm)および蛍光検出器(励起波長:450nm、検出波長:522nm)を用いた。分画物に対して一重項酸素検出試薬であるSinglet Oxygen Sensor Green(SOSG、Thermo Fisher Scientific社製)を用いて、白色LED光(Fig. 1)を1時間照射して一重項酸素の検出を行った。測定には分光蛍光光度計(FP-6500、JASCO社製)を用いた。なお、対照コントロールとして、SOSGを添加後、遮光し同時間放置したものを用意した。

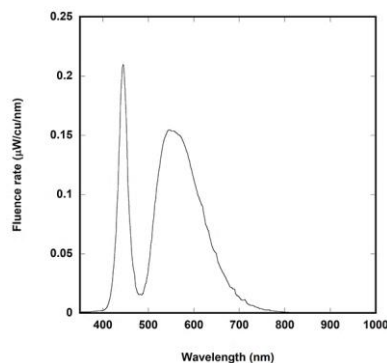


Fig. 1 白色LED光の発光スペクトル

(2) PDAを設けたHPLCによる*S. aureus*抽出成分の分画と同定

TSA培地で培養した*S. aureus* ATCC29213を、滅菌生理食塩水を用いてMcFarland 0.5に調整し、TSB培地に添加して恒温振とう培養した。遠心分離後、上清を取り除き、エタノールを添加して超音波装置にて破碎後、上清を分取して抽出液を調製した。調製した抽出液中の成分分画に

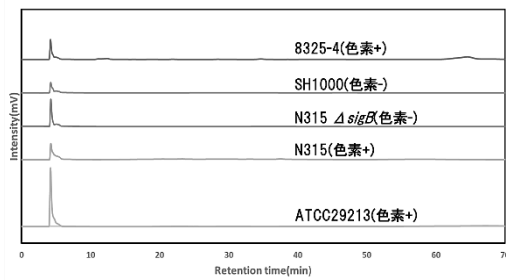


Fig. 2 HPLC クロマトグラム (UV-VIS)

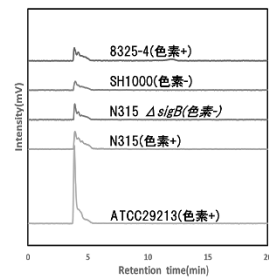


Fig. 3 HPLC クロマトグラム

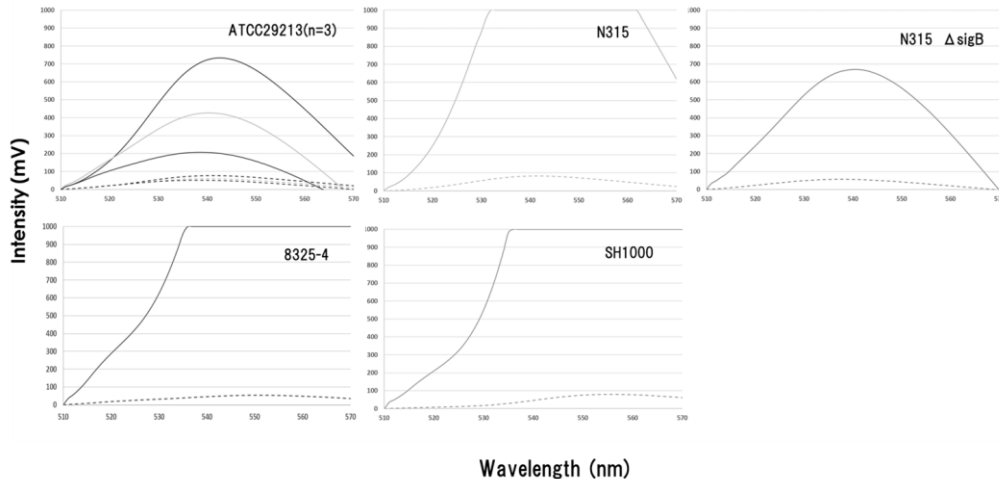


Fig. 4 SOSG を用いた一重項酸素の生成測定

は、PDA 検出器およびフラクションコレクタを備えた HPLC (島津製作所社製) を用いた。カラムには ODS カラム (カラム温度: 40°C)、溶離液にはエタノール (流速: 0.5 mL/min) を用いた。さらに、分画成分に SOSG 溶液を添加し、白色 LED 光を 60 分間照射した。照射後、励起波長 488 nm で 500~700 nm の蛍光スペクトルを、分光蛍光光度計を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) 異なる *S. aureus* 株抽出成分による活性酸素種生成

Fig. 2 に被検菌株 5 菌株からの抽出成分の紫外一可視検出器 (UV-VIS、検出波長: 450 nm) の HPLC クロマトグラムを示す。全て抽出成分において保持時間 5 分前後にピークが認められた。また、蛍光検出器 (FL、励起波長: 450 nm、検出波長: 522 nm) のクロマトグラム (Fig. 3) から、UV-VIS 同様、保持時間約 5 分に蛍光ピークが確認された。これら結果から、いずれの *S. aureus* 株においても、保持時間約 5 分のピークに寄与する共通成分が存在していることが示唆された。

この成分は、450 nm に吸収をもつと同時に蛍光発光することから、光増感作用を有する可能性がある。そこで、この成分を分画し、SOSG を用いて白色 LED 光照射による一重項酸素生成を確認した。その結果を Fig. 4 に示す。ここで、SOSG は一重項酸素と反応して 530 nm 付近に蛍光発光を示すことが知られている³⁾。いずれの菌株においても、得られた分画成分は、白色 LED 光未照射の場合、蛍光発光は認められなかったが (図中点線)、白色 LED 光照射に伴い 530 nm 付近に蛍光発光することが確認された (図中実線)。この結果から、保持時間約 5 分の成分は光増感作用を有する内在性 PS である可能性が高い。

一般に、*S. aureus* はカロテノイド系色素の一種であるスタフィロキサンチン (Staphyloxanthin: STX, Fig. 5) とよばれる黄色色素を産生する⁴⁾。今回用いた菌株 ATCC29213、N315、N315 Δ sigB、8325-4 および SH1000 のうち、ATCC29213 は *S. aureus* 標準菌株として利用しており STX を産生する。N315 は ATCC29213 と同じ程度の STX を産生する株である。N315 Δ sigB は sigB 遺伝子という多くの遺伝子を一括して制御する因子が欠損しており色素産生に関与する Crt 遺伝子群が発現せず STX を産生しない。8325-4 は sigB 遺伝子制御因子を変異により欠くため STX を産生せず、SH1000 はその制御因子を修復させたもので STX を産生することができる。今回の検討で STX 産生菌株および非産生菌株にかかわらず保持時間約 5 分にピークを示したことから、内因性 PS と推定される保持時間約 5 分の成分は、*S. aureus* が産生する STX に直接的に関与しない化合物であることがわかった。

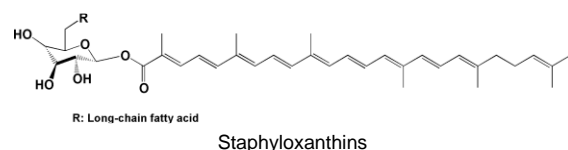


Fig. 5 スタフィロキサンチン (STX) の化学構造

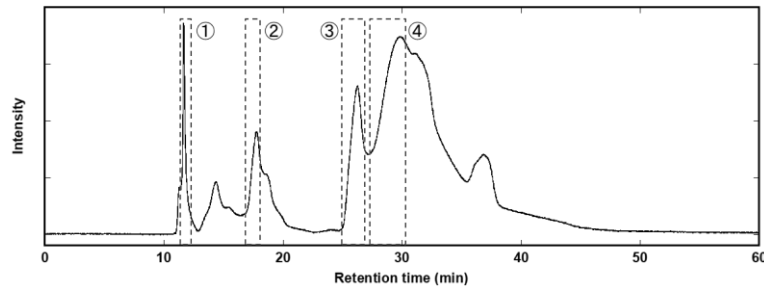


Fig. 6 HPLC クロマトグラム

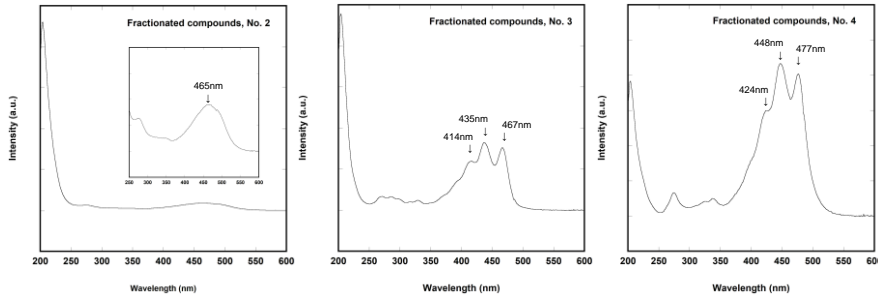


Fig. 7 ピーク②～④の吸収スペクトル

(2) PDA を設けた HPLC による *S. aureus* 抽出成分の分画と同定

PDA を設けた HPLC を用いて *S. aureus* 抽出成分を分画し、それぞれの分画成分の同定を試みた。Fig. 6 は 460nm で検出した HPLC クロマトグラムである。図から明らかなように、複数のピークが確認された。このうち比較的ピーク強度が大きい成分①～④を分画した (図中点線)。

PDA によって測定された成分②～④の吸収スペクトルを Fig. 7 に示す。これらの吸収スペクトルには 400～500nm にカロテノイドに特有のピークが認められた。さらに、STX 生合成過程における中間生成物の構造と比較すると⁴⁾、成分②は STX、成分③および④は、それぞれ 4,4'-Diaponeurosporene および 4,4'-Diaponeurosporenic acid であると考えられる (Fig. 8)。

分画成分①は、ピーク位置から 4. (1) で得られた保持時間約 5 分のピークに相当するものと考えられ、光増感作用を有する内在性 PS である可能性が高い。そこで、成分①の蛍光スペクトルを測定したところ、520nm 付近にピーク (励起波長: 450nm) が観察された (Fig. 9)。さらに、SOSG を用いて、白色 LED 光を照射した際の成分①における一重項酸素の生成を検討した。その結果を Fig. 10 に示す。成分①に SOSG を加えて暗所にて放置した場合、蛍光発光はほとんど認められなかった (■) が、白色 LED 光を照射すると 530nm 付近の蛍光ピークが認められた (○)。また、SOSG 単体 (●) および成分①単体 (□) に白色 LED 光を照射しても蛍光ピークは認められなかった。これらの結果から、成分①は光増感作用を有することが確認された。

Fig. 11 に PDA による成分①の吸収スペクトルを示す。図から明らかなように 220nm および 260nm 付近に吸収ピークが認められた。しかし、分画成分②～④とは異なり、波長 400～500nm に

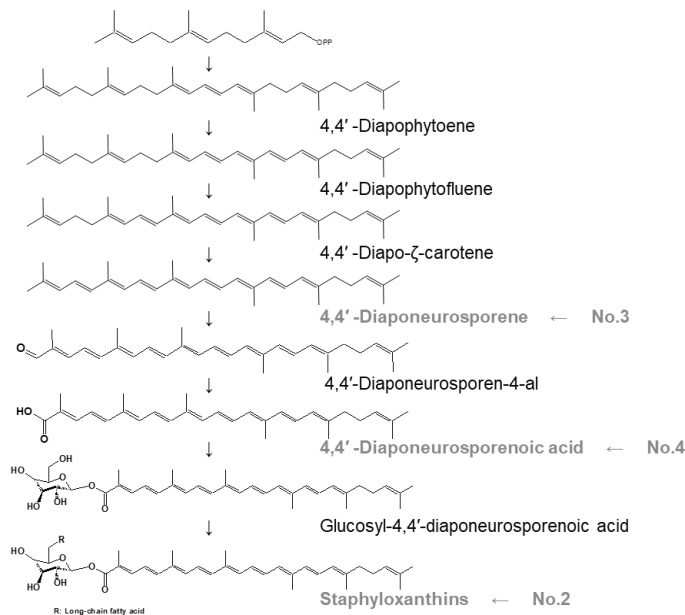


Fig. 8 *S. aureus* における STX 生合成経路 (右の数字は分画成分番号)

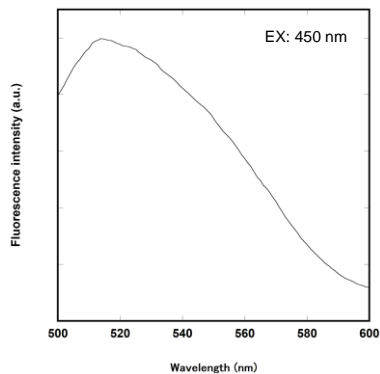


Fig. 9 成分①の蛍光スペクトル

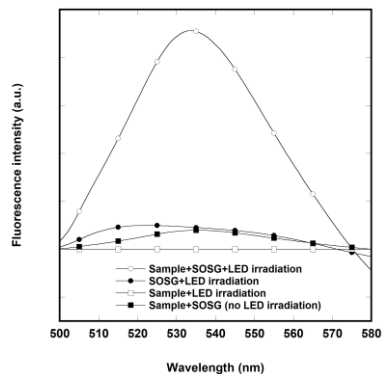


Fig. 10 SOGS による一重項酸素の測定

ピークは認められなかった。このことから、成分①はカロテノイド系化合物ではないと考えられる。4. (1)の結果と合わせて考えると、成分①は *S. aureus* が産生する STX に直接関与せず、*S. aureus* に普遍的に存在する内因性 PS である可能性が高い。

成分①の化学構造を決定するため、NMR 測定を行った。しかし、試料濃度が低かったこともあり、現状、アルケン構造が含まれていることは確認できたが、それ以上の情報は得られなかった。

本研究の総括は以下の通りである。*S. aureus* を対象に白色 LED 光照射に伴う nPS-PDI 効果作用機序の解明を目的に、*S. aureus* 内因性 PS の探索を行った。一連の研究結果から、内因性 PS は *S. aureus* 菌株に関わらず普遍的に存在し、*S. aureus* が産生する黄色色素である STX とは直接関与しない化合物であることが示唆された。また、その化合物は化学構造中アルケン構造を有していることが確認されたが、化合物の同定までには至らなかった。

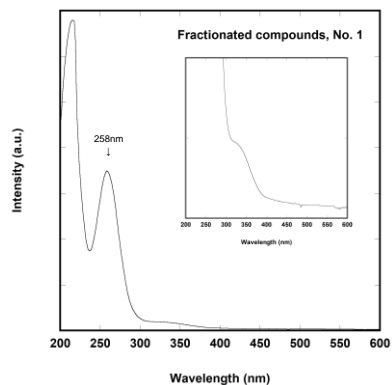


Fig. 11 成分①の吸収スペクトル

参考文献

- (1) Arisa Ogata, et.al., *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, **19**, 167-169 (2017).
- (2) 木村 誠ら, *Aesthe. Derma.*, **16**, 305-310 (2006).
- (3) H. Liu, et.al., *Sci. Rep.*, **9**, 8393 (2019).
- (4) G.-D. López, et.al., *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids*, **1866**, 158941 (2021).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 蓮沼裕也	4. 巻 97
2. 論文標題 細菌が産生する色素とその役割～臨床微生物検査の観点から～	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 色材協会誌	6. 最初と最後の頁 135-140
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4011/shikizai.97.135	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Guo Zhanglin, Jena Ajay Kumar, Takei Izuru, Ikegami Masashi, Ishii Ayumi, Numata Youhei, Shibayama Naoyuki, Miyasaka Tsutomu	4. 巻 31
2. 論文標題 Dopant Free Polymer HTM Based CsPbI ₂ Br Solar Cells with Efficiency Over 17% in Sunlight and 34% in Indoor Light	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Advanced Functional Materials	6. 最初と最後の頁 2103614 ~ 2103614
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/adfm.202103614	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 徳岡由一・和田菜・山口智子・太田英輔・池上和志・蓮沼裕也
2. 発表標題 Staphylococcus aureus内在性光増感性物質の探索
3. 学会等名 材料技術研究協会討論会2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山田春菜, 蓮沼裕也, 徳岡由一
2. 発表標題 ブルロニック系界面活性剤で可溶化したプロトポルフィリンIXの細菌集積による光線力学的不活化
3. 学会等名 第34回日本臨床微生物学会総会・学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 船寄光秀、蓮沼裕也、徳岡由一
2. 発表標題 Staphylococcus aureusにおける内在性光増感性候補物質証明のための基礎的検討
3. 学会等名 第43回日本光医学・光生物学会
4. 発表年 2021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	池上 和志 (Ikegami Masashi) (30375414)	桐蔭横浜大学・医用工学部・教授 (32717)	
研究分担者	蓮沼 裕也 (Hasunuma Yuya) (70643013)	桐蔭横浜大学・医用工学部・講師 (32717)	

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
---------	---------