

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：32666

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659284

研究課題名(和文) アクリジンオレンジ光線力学療法による耐性菌感染の制御

研究課題名(英文) Acridine orange photodynamic antimicrobial chemotherapy for drug resistant bacterias

研究代表者

角田 隆 (Tsunoda, Ryu)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：10386188

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円、(間接経費) 720,000円

研究成果の概要(和文)：アクリジンオレンジ光線力学療法を用いて細菌の増殖が抑制できるかどうかについて検討した。

アシネトバクター、バンコマイシン耐性腸球菌、腸球菌、メチシリン耐性ブドウ球菌、黄色ブドウ球菌はアクリジンオレンジ濃度が50 $\mu$ g/mlで優位に増殖が抑制され、増殖率はそれぞれ4%、17%、18%、7%、15%であった。本法による細菌の増殖抑制のメカニズムは明らかにすることはできなかったが、メチシリン耐性ブドウ球菌に対しては比較的強い増殖抑制効果がみられたことから、骨関節感染症などの分野においては臨床応用も可能ではないかと考えられた。

研究成果の概要(英文)：The effect of acridine orange photodynamic antimicrobial chemotherapy for drug resistant bacterias was examined.

Growth was significantly suppressed at 50 microgram/ml of acridine orange solution in Acinetobacter, vancomycin-resistant enterococci, enterococci, methicillin-resistant Staphylococcus aureus, Staphylococcus aureus, the growth rate was 4%, 17%, 18%, 7%, and 15% respectively.

It was not revealed mechanism of growth inhibition of bacteria by the present method. Since the relatively strong growth inhibitory effect was observed against methicillin-resistant Staphylococcus aureus, it was considered that acridine orange photodynamic antimicrobial chemotherapy was also possible clinical application in infection of bone and soft tissue.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学・臨床微生物学

キーワード：光線力学療法 アクリジンオレンジ 感染症

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 各種感染症の治療に際して抗菌薬の登場は大きな貢献を果たした。しかしながら、乱用ともいわれるような使用が行われた結果薬剤耐性を有する菌が世界的に増加してきている。耐性菌に対して新しい抗菌薬が開発されてはいるものの、さらに耐性菌が出現するというイタチごっこになってしまっているという現状がある。

(2) 様々な光感受性物質を用いた光線力学療法は「古代ギリシア」の時代に始まったと言われている、実際にヒトの感染症の治療に応用されたこともある。しかしながら抗菌薬の登場により廃れてしまった。実験レベルでは、1900年代には細菌だけではなくウィルス、真菌などに対しても、光線力学療法で増殖を抑制することができたという報告が散見される。

(3) 光線力学療法は感染症の治療よりも悪性腫瘍の診断・治療方法のひとつとして、近年では臨床応用されている。脳腫瘍や肺がん、膀胱がんなどでは既に欧米では治療方法のひとつとして認知されており、本邦においても保険収載されるなど治療方法としての臨床応用が始まっている。

(4) 本研究で使用する「アクリジンオレンジ」は光感受性物質であり、「アクリジンオレンジ光線放射線力学療法」として悪性骨軟部腫瘍の治療方法のひとつとして臨床応用されている。

## 2. 研究の目的

(1) 抗菌薬を使用しないか、使用するにしても最小量の使用で感染症の治療を行うことを臨床上の目標として考えている。

光線力学療法を行うためには、標的とする感染巣が露出していることが必要である。したがって皮膚の感染、骨軟部組織の感染症を臨床応用する際の目的臓器と考えている。

(2) 光線力学療法によって細菌の増殖を抑制することができるかどうかを確認することが本研究の目的である。

(3) (2)の目的を達成するための至適条件を決定するために、アクリジンオレンジ液の濃度、浸漬時間、励起光の強さ、照射時間などについてのデータを集積することである。

## 3. 研究の方法

(1) 臨床分離株の11菌種を本研究に使用した。内訳はグラム陰性桿菌が緑膿菌、多剤耐性緑膿菌、アシネトバクター、多剤耐性アシネトバクター、大腸菌、ESBL産生大腸菌の6菌種、グラム陽性球菌が腸球菌、バンコマイシン耐性腸球菌、黄色ブドウ球菌、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌の5菌種である。

(2) マクファーランド濁度0.05に調整した菌懸濁液を生理食塩水で予め菌種ごとに設定した濃度に希釈する。

希釈した菌懸濁液を普通寒天培地に均一に塗布する。

10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ と 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の 2 種類の濃度のアクリジンオレンジ液を培地に加えて 10 分間浸漬する。

アクリジンオレンジ液を排液した後に生理食塩水で洗い流す。

AO 処置群には、紫外線、赤外線を除いた 400~700nm の可視光領域のみに限定したキセノン全光を 10 分間照射する。光の強さは 23000lux である。コントロール群には光照射を行わない。

インキュベーターで 16~20 時間培養する。

形成されたコロニー数を計数する。

計測したコロニー数を菌種ごとに AO 処置群とコントロール群とで Welch 法により検定を行う。コントロール群に対する AO 処置群のコロニー数を増殖率として算出する。

#### 4. 研究成果

(1) 菌種によりアクリジンオレンジ光線力学療法による増殖抑制効果は異なっていた。アクリジンオレンジ液濃度 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ で増殖数に統計学的に優位の差がみられたのは、腸球菌、バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE)、黄色ブドウ球菌 (MSSA)、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA)、アシネトバクターの 5 菌種であった。

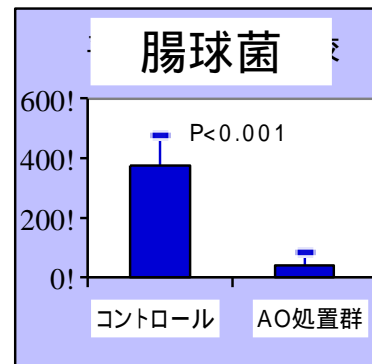


図 1 腸球菌のコロニー数の比較

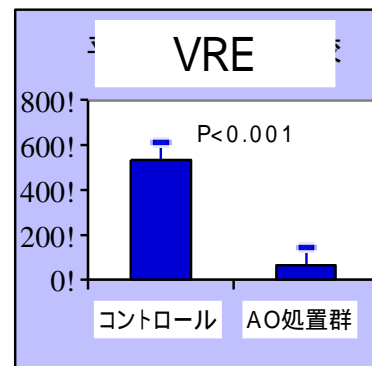


図 2 バンコマイシン耐性腸球菌のコロニー数の比較

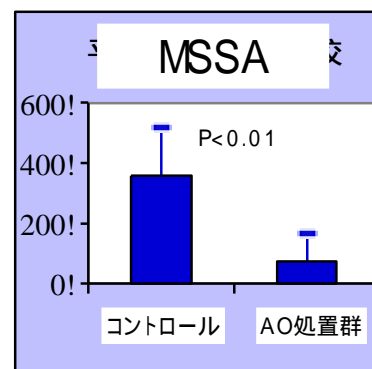


図 3 黄色ブドウ球菌のコロニー数の比較

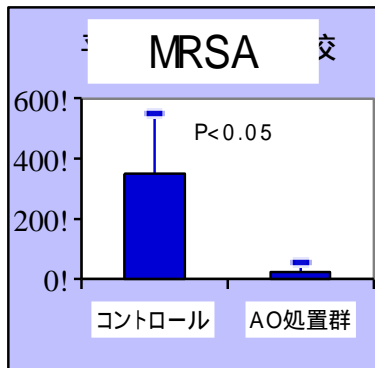


図4 メチシリン耐性黄色ブドウ球菌の  
コロニー数の比較

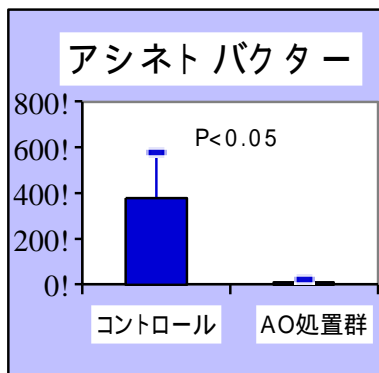


図5 アシネトバクターのコロニー数の比較

(2) この5菌種における増殖率は、腸球菌が18%、バンコマイシン耐性腸球菌が17%、黄色ブドウ球菌が15%、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌が7%、アシネトバクターが4%であった。

(3) アクリジンオレンジ液の濃度が高い程増殖率を低下させることができた。アクリジンオレンジ液濃度を  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  から  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  に上げると、腸球菌、バンコマイシン耐性腸球菌、黄色ブドウ球菌、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌、アシネトバクターの6菌種で増殖率が低下した。

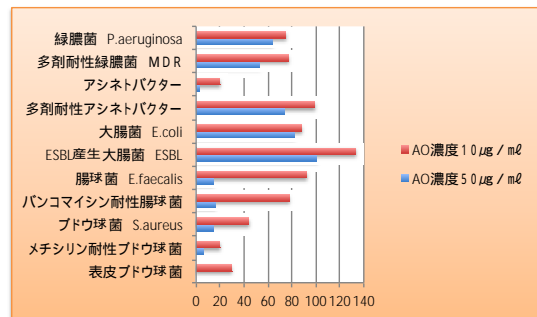


図6 アクリジンオレンジ液濃度による  
増殖率の変化

(4) 以上の結果から表皮ブドウ球菌、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌は低いアクリジンオレンジ液濃度でも5%程度以下まで増殖率を抑制することが確認できた。骨軟部組織の感染症においては、起因菌の多くがメチシリン耐性黄色ブドウ球菌であり、さらに抗菌薬投与によっても難治性であることから、アクリジンオレンジ光線力学療法は骨軟部組織の感染症に対する治療法のひとつとなり得る可能性が示唆されたと考える。

(5) 本研究ではアクリジンオレンジ光線力学療法で細菌増殖を抑制する機序については解明できていないため、今後は機序の解明も含めて臨床応用に向けてのさらなる実験が必要であると考えます。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計4件)

角田 隆、アクリジンオレンジ光線力学療法による新しい感染症治療法の検討、第29

回日本環境感染学会、2014年2月15日、東京

角田 隆、アクリジンオレンジ光線力学療法による新しい感染症治療法の検討、第5回アクリジンオレンジ治療研究会、2014年1月25日、京都

角田 隆、アクリジンオレンジ光線力学療法による新しい感染症治療法の検討、2012年4月28日、鹿児島

角田 隆、アクリジンオレンジ光線力学療法の感染症治療への応用、2012年4月21日、箱根

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕(計0件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

角田 隆 (TSUNODA, Ryu)  
日本医科大学・医学部・助教  
研究者番号：10386188

### (2) 研究分担者

高井 信朗 (TAKAI, Shinro)  
日本医科大学・医学研究科・教授  
研究者番号：10226730

高橋 謙治 (TAKAHASHI, Kenji)  
日本医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：30347447

前田 美穂 (MAEDA, Miho)  
日本医科大学・医学部・教授  
研究者番号：90173715

野呂瀬 嘉彦 (NOROSE, Yoshihiko)  
日本医科大学・医学部・助教  
研究者番号：10097024  
(平成24年度)

根井 貴仁 (NEI, Takahito)  
日本医科大学・医学部・助教  
研究者番号：30597670  
(平成25年度)

河路 秀巳 (KAWAJI, Hidemi)  
日本医科大学・医学部・講師  
研究者番号：90277517  
(平成25年度)

### (3) 連携研究者

なし