

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861726

研究課題名(和文) MRSA感染熱傷創に対する光線力学療法の検討

研究課題名(英文) Photodynamic therapy for methicillin-resistant staphylococcus aureus infected burn wound

研究代表者

森本 訓行 (Morimoto, Kuniyuki)

大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・医員

研究者番号：10648562

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：in vitroにおいて、5-ALAをMRSAに添加した際に、緑膿菌と比べ総ポルフィリン量は3倍に増加し、そのうち16%がPpであった。5-ALAとEDTAを同時に添加した場合は、緑膿菌内ではPpの量が7倍に増加したのに対し、MRSA内では16%から11%に減少した。MRSAに対しては5-ALA単独投与の方が効果的であることがわかった。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た。これによりALA-PDTはMRSA感染潰瘍の新たな治療法になる可能性あることが示された。

研究成果の概要(英文)：An in vitro study, total porphyrin production in MRSA was increased three times from *P. aeruginosa* when 5-ALA was added, and 16% were protoporphyrin 9 in quantity of porphyrin. It decreased from 16% to 11% in the MRSA whereas Pp rose 7 times in *P. aeruginosa* when ALA and EDTA were added simultaneously. This result shows administration of 5-ALA alone was effective without adding EDTA in PDT for MRSA. An in vivo study, we demonstrated that Pp 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. Our findings indicate that ALA-PDT may be a new treatment option for MRSA-infected wound.

研究分野：形成外科

キーワード：光線力学療法 MRSA 5-アミノレブリン酸 熱傷

## 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 感染熱傷創に対する 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 感染熱傷創に対する 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、MRSA 感染熱傷創に対する 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、今回我々の目的は熱傷創に存在す

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 の励起率が高い波長 410nmLED を光源として使用する。

## 3. 研究の方法

### (1) in vitro

#### 使用菌種、光感受性物質及び光源

グラム陽性球菌として MRSA(ATCC 33591)を、グラム陰性桿菌として緑膿菌(BAA-2110)を Tryptic Soy Brouth (TSB)で培養し使用。光感受性物質は 5-ALA を生理食塩水で目的の濃度に希釈した。光源は、波長 410 nm (青色) 使用した。

菌種の違いによるポルフィリン類の蓄積 MRSA 及び緑膿菌を 250  $\mu$ l の PSB に入れ、超音波でホモジナイズした。酢酸とジメチルホルムアミド、イソプロパノール液を加え遠心分離を行い、高速液体クロマトグラフィーで緑膿菌内のポルフィリン量を分析した。また、ポルフィリン代謝を経て Pp が産生された後、Pp に 2 価鉄イオンが配位されヘムとなる為、2 価鉄イオンを取り除く為にエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を加え、Pp の産生量を測定した。

### (2) in vivo

糖尿病マウスの背部に 2 度熱傷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、マウス背部を除毛し、4cm 角の面積に 90 度の熱湯を接触させ、2 度熱傷創を作成する。その後、 $1 \times 10^{10}$ CFU/ml に調整した MRSA を接種し、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、作成した熱傷創に 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生存率を確認する。

MRSA 感染皮膚欠損創に対する PDT 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、マウス背部を除毛し直径 6 mm の皮膚欠損創を作成する。その後、 $1 \times 10^{10}$ CFU/ml に調整した MRSA を接種し、フィルム材を貼付する。2 日後、マウスの腹腔内に 5-ALA を投与し、作成した皮膚欠損創に 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を確認する。

#### 4. 研究成果

##### (1) in vitro

in vitroにおいて、高速液体クロマトグラフィーを用い、5-ALA を MRSA に添加した際に、緑膿菌と比べ総ポルフィリン量は3倍に増加した(図1)。またそのポルフィリン量のうち16%が Pp であることがわかった。また EDTA を同時に添加した場合は、緑膿菌内では Pp の量が7倍に増加したのに対し、MRSA 内では16%から11%に減少し、総ポルフィリン量も15%減少することがわかった(図2)。この結果により MRSA に対しては EDTA を添加せずに PDT を行った方が効果的であり、緑膿菌には EDTA を添加した方が効果的であることがわかった。

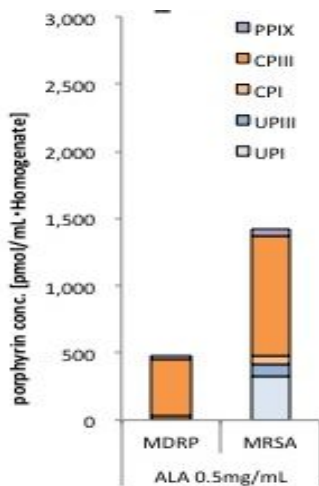


図1 ALA 添加時の緑膿菌と MRSA のポルフィリン量

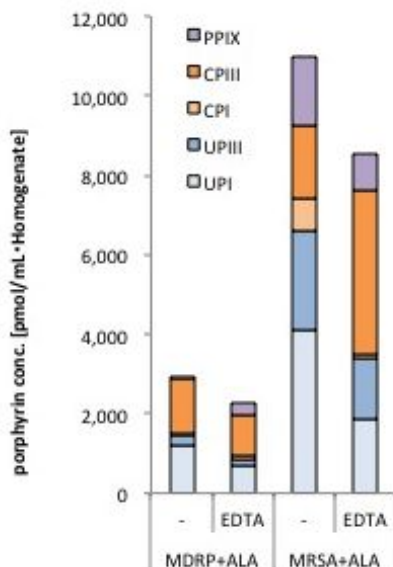


図2 ALA 及び EDTA 添加時のポルフィリン量

##### (2) in vivo

熱傷創作成し、5-ALA を全身投与して PDT を行おうとしたが、生存率が極端に低かった。そのため小さい皮膚欠損創に変更し、MRSA を接種し、5-ALA を全身投与して PDT を行った。

8~10 週齢の雄糖尿病マウスの背部に直径 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  $10^{10}$  CFU/cm<sup>2</sup> の MRSA を接種し、MRSA 感染皮膚潰瘍モデルを作成した。このマウスに 5-ALA 200 mg/kg を腹腔内注射し、24 時間後にウッド灯を照射したところ、MRSA 感染創では強い赤色蛍光を示した(図3)。この結果により、5-ALA 全身投与により、創面の MRSA に Pp が蓄積していることが示唆された。次にモデルマウスに対して、5-ALA 200 mg/kg を腹腔内注射し、24 時間後に青色 LED を照射量 50 J/cm<sup>2</sup> で創部に照射し PDT を連日行った。その結果、ALA-PDT 群では、MRSA を接種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。(図4)。また創部の菌数も ALA-PDT 群では未治療群と比べ 1/100 に減少した。以上の結果から、青色 LED を用いた 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考えられた。

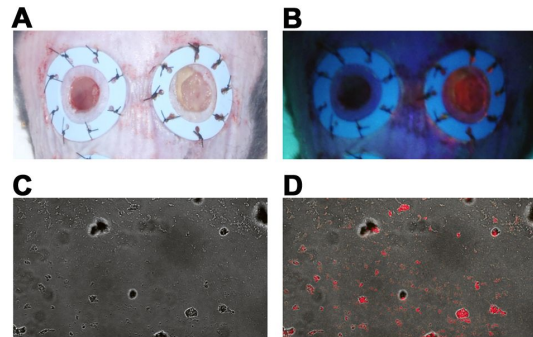


図3 5-ALA 全身投与による MRSA 感染創への Pp の蓄積

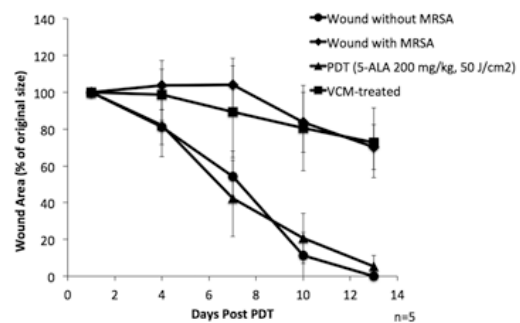


図4 創面積の経時的変化

#### 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)

[雑誌論文](計2件)

森本訓行、小澤俊幸、栗津邦男、鶴田大輔、耐性菌を生み出さない新たな MRSA 感染治療法、化学、査読無し、70 巻、2015、34-35 DOI:なし

Kuniyuki Morimoto, Toshiyuki Ozawa,  
Kunio Awazu, Nobuhisa Ito, Norihiro  
Honda, Sohkiichi Matsumoto, Daisuke  
Tsuruta, Photodynamic Therapy Using  
Systemic Administration of  
5-Aminolevulinic Acid and a 410-nm  
Wavelength Light-emitting Diode for  
Methicillin-resistant *Staphylococcus*  
*aureus*-infected Ulcers in Mice, Plos  
One, 査読有、9 卷、2014、e105173  
DOI:10.1371/journal.pone.0105173

6 . 研究組織

(1)研究代表者

森本訓行 (Morimoto Kuniyuki)

大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・

医員

研究者番号 : 10648562