

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 16 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462762

研究課題名(和文)多剤耐性菌皮膚潰瘍に対する5-ALA全身投与によるPDT研究

研究課題名(英文) Photodynamic therapy using systemic administration of 5-aminolevulinic acid for multidrug-resistant bacteria-infected ulcers

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・講師

研究者番号：50570602

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：緑膿菌感染皮膚潰瘍モデルマウスに対して、EDTA-2Na配合ALA軟膏を使用したPDTの効果を確認した。まず、感染させていない正常潰瘍は13日目に上皮化したのに対して、緑膿菌感染潰瘍は13日目に上皮化せず、臨床と同様に感染潰瘍は創傷治癒が遅延した。その後、この感染潰瘍に連日PDTを行ったところ、正常潰瘍と同様に13日目に上皮化した。以上より、緑膿菌感染潰瘍に対する、新たな耐性菌を生じないPDTは、殺菌効果および創傷治癒促進効果があることがわかった。EDTA-2Na配合ALA軟膏を使用したPDTは緑膿菌感染皮膚潰瘍に対する新たな治療法の1つに成り得ると考えた。

研究成果の概要(英文)：Photodynamic therapy (PDT) is believed to have the potential to be a non-antibiotic treatment for infections. 5-Aminolevulinic acid (ALA), which works as a photosensitizer after it is metabolized protoporphyrin IX (PpIX) in heme synthetic pathway, is used for PDT. Thus far, the in vivo effectiveness of PDT using ALA against PA is still unknown. In this study, we investigated it both in vitro and in vivo. The results revealed that although PDT with ALA alone does not show a bactericidal effect against PA, PDT with both ALA and EDTA-2Na does in in vitro experiments, because PpIX has increased in PA in the latter. In in vivo experiments, a wound was healed faster in PA-infected mice using PDT with both EDTA-2Na and ALA than non-PDT. These results suggest that PDT with EDTA-2Na and ALA has a potential novel treatment option for PA-infected wound.

研究分野：光線力学療法

キーワード：光線力学療法 細菌 皮膚潰瘍

1. 研究開始当初の背景

光線力学療法 (Photodynamic Therapy:PDT)

PDT とは、生体内に光感受性物質を注入し、標的となる生体組織に特定の波長の光を照射することにより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。現在、悪性腫瘍に対する研究及び臨床応用は全世界で数多くなされているが、感染症に対する研究は、ほとんど行われていない。PDT の感染症治療に対する最大の特徴は、耐性菌を生じないこととされている。

光感受性物質の1つである5-アミノレブリン酸 (5-ALA)

天然アミノ酸である5-ALAに光感受性はないが、細胞および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。Pp に励起波長を当てることにより活性酸素が発生し細菌を死滅させることができる。5-ALA は現在、脳外科領域で脳腫瘍摘出時における術中蛍光診断で使用される希少疾病医薬品として保険収載され、安全性は確立されている。

グラム陽性菌に対する 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、DNA の合成を阻害することと、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する2つの機序があると報告している。我々も in vitro で5-ALA と410nmLED の組合せによる PDT で、MRSA に対し良好な殺菌効果を得られることを確認している(Fig1)。(科研費:24791916, 10648562)

グラム陰性菌に対する PDT

上記のごとく、グラム陽性菌感染症に対す

る PDT の有効性の報告は散見されるが、グラム陰性菌に対する PDT の有用性の報告は皆無である。グラム陰性菌は細胞膜の2重構造や biofilm、薬剤排出ポンプの存在により PDT が効きにくいとされる(Malik. Photochem Photobiol. 1992)。特に MDRP は様々な色素を産生するため、有効な波長も不明であった。そこで、我々は科研費(30647912)を得て、MDRP に対する PDT 研究を行ったところ、5-ALA とキレート剤と410nmLEDを組み合わせた PDT で、in vitro において十分な静菌作用があることを解明した

2. 研究の目的

広範囲熱傷患者の最大の死因である敗血症を予防するには、出来る限り早く創を閉鎖することが重要である。そのため、多くの場合植皮術が行われる。医師は創部の洗浄処置、抗生剤投与で感染コントロールを行い、植皮の生着および良好な上皮化を目指す。治療期間が長期になればなるほど、多剤耐性菌の出現によりコントロールに難渋するケースが多い。そこで今回我々は、上皮化及び創傷治癒の最大の障害となると考えられる多剤耐性菌感染皮膚潰瘍 (MRSA および MDRP の混合感染) に対し、5-アミノレブリン酸を全身投与する光線力学療法を施行し、感染コントロールを行い創傷治癒の促進を試みる研究計画を立案した。

3. 研究の方法

緑膿菌を培養し、光感受性物質として ALA を、光源として410nmLEDを使用し、PDTを行った。また、ALA と同時に、EDTA-2Na を投与し、その効果を検討した。

また、in vitro で得られた、ALA 及び EDTA-2Na の濃度を用いて、緑膿菌感染皮膚潰瘍モデルに対して、PDT を行った。

4 研究の成果

緑膿菌に対する ALA-PDT (*in vitro*)

緑膿菌に対する ALA-PDT の殺菌効果を検討するため、はじめに *in vitro* で PDT を行った。方法は、MRSA と同様、緑膿菌に ALA (0.5%) を添加して培養後、波長 410 nm の LED を照射し 24 時間後菌量を測定した。結果は、PDT を行った群ではコントロール群と同様に菌量が増加し、殺菌効果を示さなかった (Fig. 3a)。

次に、ALA(0.5%) とキレート剤である EDTA-2Na (0.005%) を同時に添加して PDT を行った。結果は、ALA と EDTA-2Na を同時に添加して PDT を行った群の菌量はコントロール群と比較して有意に菌量が減少し、殺菌効果を示した。

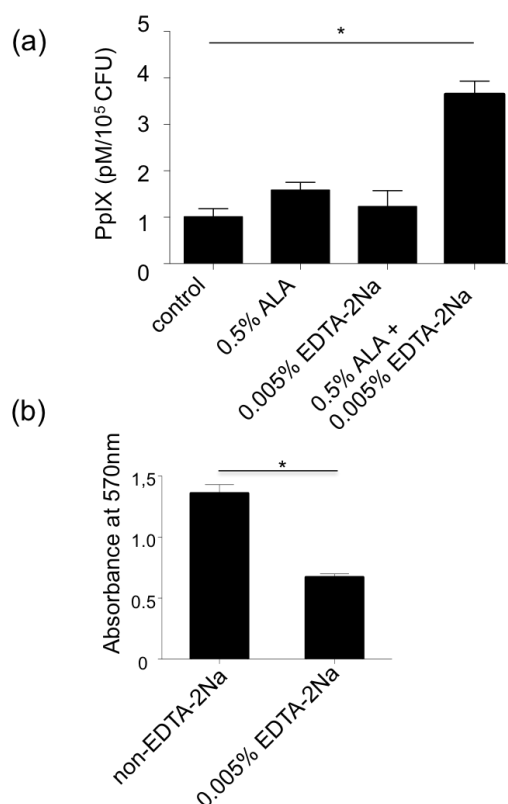
緑膿菌に対する ALA-PDT を行った際の EDTA-2Na の効果

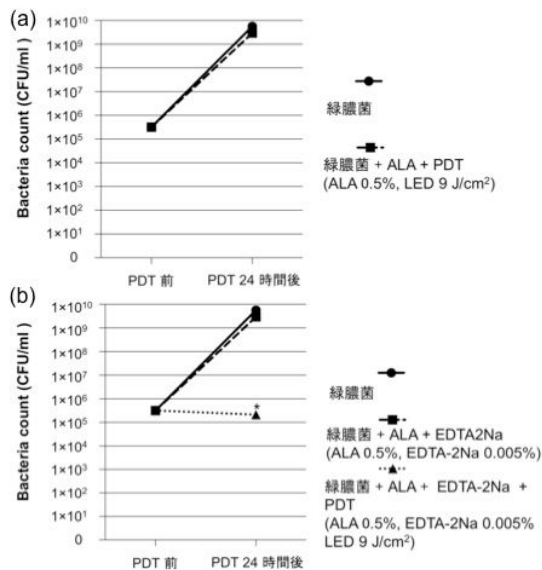
ALA を用いた PDT では、PpIX が光感受性物質であり、がん細胞に ALA と EDTA-2Na を同時に投与することで PpIX 量が増加することが知られている。緑膿菌でもがん細胞と同様に ALA と EDTA-2Na を同時に投与することで PpIX の量が増加し、殺菌効果を示すのではと推測した。仮説を確認するため、緑膿菌内の PpIX 量の測定を行った。方法は、緑膿菌に 0.5% ALA と 0.005% EDTA-2Na を同時に投与し培養後、緑膿菌から PpIX を抽出し HPLC を用いて定量した。結果は、ALA と EDTA-2Na を同時に添加した群ではコントロール群と比較して PpIX 量が有意に増加した。しかし、ALA 単独投与群はコントロール群と比較して有意な差を示さなかった。

また、緑膿菌は菌周囲に存在し粘性を示す膜であるバイオフィルムを多く産生する菌であり、バイオフィルムは抗生物質が菌に到達するのを阻害し抗生物質の効果を減

弱させる。緑膿菌に ALA と EDTA-2Na を同時に添加して培養した際、緑膿菌に ALA を単独で投与して培養した際と比較して培地の粘性が低下していた。つまり、EDTA-2Na を同時に添加することでバイオフィルムの産生が抑制され ALA や LED の光が菌まで到達でき、殺菌効果を示したのではないかと推測した。仮説を検証するために、緑膿菌に 0.005% EDTA-2Na を添加して培養後、クリスタルバイオレット法を用いてバイオフィルムの量を測定した。結果は、EDTA-2Na 添加群はコントロール群と比較してバイオフィルムの量が半減した。

以上の結果より、緑膿菌に対する PDT は ALA と EDTA-2Na を同時に添加することで PpIX 量が増加し、バイオフィルムの産生が抑制されたため、殺菌効果を示したと推測した。





緑膿菌に対する ALA-PDT (*in vivo*)

In vivo で緑膿菌に対する PDT の効果を確認するため、緑膿菌感染皮膚潰瘍モデルマウスの作成を行った。方法は、MRSA 感染皮膚潰瘍モデルマウスと同様にマウス背部に潰瘍を形成後、 10^{10} CFU/mL 緑膿菌を創面に塗布し、2 日間感染させた。結果は、感染させていない正常潰瘍は 13 日目に上皮化したのに対して、緑膿菌感染潰瘍は 13 日目に上皮化せず、臨床と同様に感染潰瘍は創傷治癒が遅延した。次に、感染潰瘍に連日 0.5% ALA と 0.005% EDTA-2Na を塗布し PDT を行ったところ、正常潰瘍と同様に 13 日目に上皮化し創傷治癒が促進された。

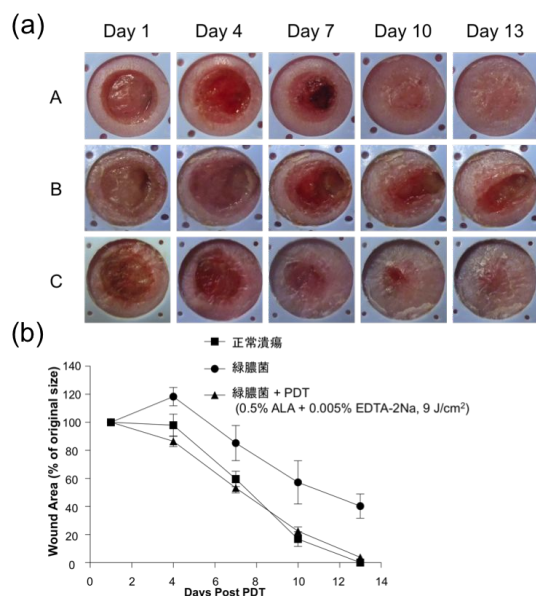


Fig. 3 緑膿菌感染潰瘍に対する PDT. (a) 潰瘍の写真 A: 正常潰瘍, B: 緑膿菌感染潰瘍, C: PDT (0.5% ALA + 0.005% EDTA-2Na, 9J/cm²). (b) 潰瘍の面積比.

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 5 件)

Cho Z, Konishi E, Kanemaru M, Isohisa T, Arita T, Kawai M, Tsutsumi M, Mizutani H, Takenaka H, Ozawa T, Tsuruta D, Katoh N, Asai J. Podoplanin expression in peritumoral keratinocytes predicts aggressive behavior in extramammary Paget's disease. *J Dermatol Sci*. 査読有り. Mar 27. 2017;pii: S0923-1811(16)30889-1. doi: 10.1016/j.jdermsci.2017.03.012.

Imanishi A, Imanishi H, Hiroyasu S, Ozawa T, Koga H, Ishii N, Kitajima Y, Hashimoto T, Tsuruta D. Anti-BP180-type mucous membrane pemphigoid immunoglobulin G shows heterogeneity of internalization of BP180/collagen XVII into keratinocyte cytoplasm. *Med Mol Morphol*. 査読有り. Jun;49(2) 2016 89-97. doi: 10.1007/s00795-015-0128-x.

Morimoto K, Ozawa T, Awazu K, Ito N, Honda N, Matsumoto S, Tsuruta D. 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*. 査読有り. Aug 20;9(8) 2014 :e105173. doi:

10.1371/journal.pone.0105173.

Ozawa T, Hiroyasu S, Tsuruta D. The role of hemidesmosomes and focal contacts in the skin visualized by dual-color live cell imaging. *Med Mol Morphol*. 査読有り. Dec;47(4) 2014 185-8. doi: 10.1007/s00795-014-0078-8.

Ozawa T, Sugawara K, Tsuruta D. The discovery of epidermal tight junctions. *Exp Dermatol*. 査読有り. Jun;23(6) 2014 393-4. doi: 10.1111/exd.12385.

〔学会発表〕(計 7 件)

Ozawa T, Morimoto K, Awazu K, Tsuruta D. Investigation of ALA-PDT for multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. 73th Annual Meeting: 2014.5.10 Albuquerque.USA.

Ozawa T, Morimoto K, Awazu K, Tsuruta D. Photodynamic therapy using systemic 5-aminolevulinic acid for MRSA-infected skin ulcers. 44th Annual ESDR: 2014.9.14 Copenhagen, Denmark.

小澤俊幸 他. 皮膚の血管病変の治療 : レーザー治療を中心に. *The 9th Niche Neuro-Angiology*: 2014.5.30 大阪大学中之島センター (大阪)

小澤俊幸 他. 光線力学療法による感染症治療. 第 47 回日本臨床分子形態学総会 2015.9.19 長崎大学 (長崎県)

小澤俊幸 他. 細菌感染に対する 5-ALA 及び青色 LED を用いた PDT. 第 36 回日本レーザー医学会総会 2015.10.24 栃木県総合文化センター (岐阜県)

小澤俊幸 他. 光線過敏を利用した皮膚科治療. 第 114 回日本皮膚科学会総会 2015.5.29 パシフィコ横浜(神奈川県)

小澤俊幸 他. 光線力学療法を用いた感

染性難治性皮膚潰瘍治療. 第 50 回緑膿菌学会シンポジウム 2016.2.5 ヒルトン東京お台場 (東京)
〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 光照射用基板
発明者: 小澤 俊幸 他
権利者: 大阪市立大学 他
種類: 特許
番号: 特許願 2016-126081 号
出願年月日: 2016 年 2 月 25 日
国内外の別: 国内

取得状況 (計 2 件)

名称: Medicinal Composition For Promoting Synthesis of Protoporphyrin IX
発明者: Masahiro Ishizuka 他
権利者: Masahiro Ishizuka 他
種類: 特許
番号: PCT/JP2014/065813
取得年月日: 2017 年 2 月 2 日
国内外の別: アメリカ合衆国

名称: プロトポルフィリン 生成促進用医薬組成物
発明者: 石塚 昌宏 他
権利者: 石塚 昌宏 他
種類: 特許
番号: 6051305 号
取得年月日: 2016 年 12 月 2 日
国内外の別: 国内

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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・講師
研究者番号: 50570602

(2) 研究分担者

鶴田 大輔 (TSURUTA, Daisuke)
大阪市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号: 90382043

(3) 研究分担者

粟津 邦男 (AWAZU, Kunio)
大阪大学・大学院エネルギー理工学研究
所・教授
研究者番号: 30324817