

論文内容要旨

Time-dependent antimicrobial effect of photodynamic therapy with TONS 504 on *Pseudomonas aeruginosa*

(緑膿菌に対する TONS 504 を用いた

光線力学的抗微生物化学療法を経時的効果)

Lasers in Medical Science, 33(7):1455-1460, 2018.

主指導教員：木内 良明教授

(医歯薬保健学研究科 視覚病態学)

副指導教員：近間 泰一郎准教授

(医歯薬保健学研究科 視覚病態学)

副指導教員：坂口 剛正教授

(医歯薬保健学研究科 ウイルス学)

末岡 健太郎

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

光線力学的療法（photodynamic therapy : PDT）は、標的細胞に特異的に集積させた光増感剤に対して、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。PDTの歴史は古く、1900年にアクリジン色素と太陽光の相互作用で、ゾウリムシが死滅したことの発見に始まるが、その後の抗生物質の発達によって微生物に対するPDTは下火となった。近年の薬剤耐性菌の増加で、抗菌PDTである光線力学的抗微生物化学療法（photodynamic antimicrobial chemotherapy : PACT）が再び注目されてきた。

我々は、角膜感染症に対するPACTの確立を目標とし、これまでに新規光増感剤 TONS 504 を用いたPACTで、種々の微生物に対する一定の有効性を示した。PACTの微生物に対する有効性に関する報告は散見されるが、抗微生物効果の出現様式についてはいまだ不明な点が多い。今回、緑膿菌に対する効果を検討した。

PACTは、水溶性カチオン性クロリン誘導体である TONS 504 と、660 nm 単波長 LED 光照射装置を用いて行った。24 well プレートに、PBS で 1×10^6 CFU/mL に菌量調整した緑膿菌を 10 μ L/well と、液体増菌培地を用いて 10 mg/L に希釈調整した TONS 504 液を 1 mL/well 入れ、そこに LED を 30 J/cm² 照射した。照射後 0、0.5、1、3、6、9、12 および 24 時間の各時点で、well から緑膿菌と TONS 504 液の混合液を 100 μ L、新たな寒天培地に播種して、遮光状態で培養後、コロニー数を計測して抗微生物効果を評価した（TONS 504-PACT 群）。さらに PACT 3 時間後に、TONS 504 は追加せずに LED を 30 J/cm² 追加照射し、追加照射の時点から、先と同様に経時的に 100 μ L を寒天培地に播種、培養して、抗微生物効果を評価した（LED 追加照射群）。無処置、TONS 504 単独、LED 照射単独も設定し、同じく経時的に寒天培地に播種した。

TONS 504 および LED 照射のそれぞれ単独では、抗微生物効果は全くなかった。TONS 504-PACT 群では、LED 照射 3~9 時間後に抗微生物効果が現れた。その効果は LED 照射 3 時間後に最も強かった。PACT 3 時間後の LED 追加照射群では、追加照射直後~3 時間後に緑膿菌はほぼ完全に死滅し、追加照射 6 時間後の時点でも TONS 504-PACT 群と比べて、より強い抗微生物効果があった。

PACT の抗微生物メカニズムは、一重項酸素による細胞壁や細胞膜の傷害といわれている。一重項酸素の短い拡散距離を考慮すると、光増感剤分子が細菌に付着する必要があるが、細胞壁構造の違いと電荷的反発のために、グラム陰性菌では PACT の効果が乏しいことが知られている。我々が用いている新規光増感剤 TONS 504 は、高い光増感効率を有し、かつカチオン性（正電荷）誘導体で微生物表面と電荷的に反発しないため、グラム陰性菌の緑膿菌に対しても効果があり、PACT における光増感剤として有用と考えられた。

今回、PACT の抗微生物効果は光化学反応が起こった直後ではなく、経時的に発揮されることを明らかにした。PDT が腫瘍細胞のアポトーシスを誘導することはすでに報告されている。微生物細胞にもアポトーシス機構があり、ストレスによってプログラム細胞死が誘導されることが明らかになっており、このアポトーシス機構によって PACT の抗微生物効果が経時的に発現した可能性が考えられる。

また、LEDの追加照射でさらなる抗微生物効果が得られたのは、残存する光増感剤が再励起したためと考えられ、今後のPACTプロトコール設定における貴重な結果が得られた。

薬剤耐性菌は、種々の感染症治療において喫緊の課題であり、新たな薬剤耐性菌を生み出さないためにも、物理的抗菌技術であるPACTは非常に期待される感染症治療である。