

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	末岡 健太郎
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 ①・2 項該当		
論文題目 Time-dependent antimicrobial effect of photodynamic therapy with TONS 504 on <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (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の経時的効果)			
論文審査担当者			
主 査	教授	大毛 宏喜	印
審査委員	教授	一戸 辰夫	
審査委員	教授	菅野 雅元	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>光線力学的療法（photodynamic therapy：PDT）は、低比重リポ蛋白（low-density lipoprotein）レセプター活性が上昇している癌細胞や新生血管などの標的細胞に特異的に集積する光感受性物質を取り込ませる。そして、特定波長の光を照射することで活性酸素種を発生させて、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との相互作用で、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 研究は下火になった。近年の抗生物質の濫用による種々の薬剤耐性菌の出現で、抗微生物薬に頼らない抗菌 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。</p> <p>著者らは、角膜感染症に対する PACT の確立を目標とし、これまでに新規光感受性物質 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 の抗微生物効果は、活性酸素種、とくに一重項酸素による細胞壁や細胞膜の傷害に主に起因すると考えられており、一重項酸素の短い拡散距離（最大 0.3 μm）を考慮すると、光増感剤分子が微生物表面に付着する必要がある。微生物の表層には各種糖タンパク質ポリマーが存在し、生理的環境下においては負電荷を帯びている。従来 PDT に用いられている光感受性物質のほとんどがアニオン性（負電荷）の誘導体であり、電荷的反発が生じる。一方、著者らが用いている TONS 504 は、カチオン性（正電荷）のクロリン誘導体でありかつ、高い光増感効率を有しているため、PACT における光感受性物質として非常に有用であると考えられる。PACT の抗微生物効果は、寒天培地上に播種した微生物に対して光を照射することで評価することが多いが、この方法では抗微生物効果を経時的に評価することが難しい。本研究では、液体培地中に散布した微生物に対して PACT を行った後に様々な時点で微生物混合液を寒天培地に播種し、コロニー形成を観察することで、TONS 504-PACT の抗微生物効果を経時的に評価することにした。</p> <p>PACT には、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 光照射装置を用いた。24 well プレートに、PBS で 1×10^8 colony forming units (CFU)/mL に菌量調整した緑膿菌 10 μL と、緑膿菌の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 をそれぞれの well に入れ、その混合液に対して LED を 30 J/cm^2 照射した。well 内の混合液の温度上昇を避けるために、LED 照射は断続的に計 9 分間行った。LED 照射終了後 0、0.5、1、3、6、9、12 および 24 時間の各時点において、新たな寒天培地に緑膿菌と TONS 504 液の混合液 100 μL を播種した。遮光状態で 36 時間培養後、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 を追加せずに LED の追加照射（30 J/cm^2）を行い、追加照射終了の時点から、先と同様に経時的に well 内の混合液 100 μL 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）。コントロールとして、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。</p> <p>結果は以下のごとくまとめられる。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 1 時間後の時点では抗微生物効果は明らかでなかったが、3～9 時間後に抗微生物効果を示した。その効果は LED</p>			

照射の3時間後に最も強く、コロニー数は 93.2 ± 16.7 CFU まで減少した。PACT 3時間後に LED 追加照射した群では、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。

今回、TONS 504-PACT の抗微生物効果が、光化学反応に遅れて出現することを明らかにした。すでに臨床応用されている抗腫瘍 PDT において、PDT が腫瘍細胞のアポトーシスを誘導することが以前から知られている。多細胞生物だけでなく原核生物にもアポトーシス機構が存在し、種々のストレスによりプログラム細胞死が誘導されることが、近年明らかになった。PACT における活性酸素種が、細菌のアポトーシスを誘導した可能性があるが、今後の検討を要する。

また、LED の追加照射によって抗微生物効果が増強されたのは、基底状態 (S_0) のエネルギー準位に戻った光感受性物質が、LED の追加照射によって再び励起し、一重項酸素を発生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情報が得られた。

以上の結果から、本論文は感染症治療として期待される PACT の開発に極めて重要な情報を加えたと考えられる。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	末岡 健太郎
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 Time-dependent antimicrobial effect of photodynamic therapy with TONS 504 on <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (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の経時的効果)			
最終試験担当者			
主査	教授	大毛 宏喜	印
審査委員	教授	一戸 辰夫	
審査委員	教授	菅野 雅元	
<p>[最終試験の結果の要旨]</p> <p style="text-align: center;">判 定 合 格</p> <p>上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成31年1月7日の第77回広島大学研究科発表会（医学）及び平成31年1月11日の本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1 PDTにおける光感受性物質の標的細胞への特異的集積性 2 PACTの正常角膜組織に対する影響 3 莖膜の有無によるPACTの抗微生物効果の差 4 TONS 504の物性特徴 5 臨床応用の際にクリアしなければならない点 6 アメーバやウイルスに対するTONS 504-PACTの有効性 <p>これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。</p>			