

論文内容要旨

Molecular characteristics of the photosensitizer
TONS504: Comparison of its singlet oxygen quantum
yields and photodynamic antimicrobial effect with those
of methylene blue

(光増感剤 TONS504 の分子的特徴: メチレンブルーとの一重
項酸素生成量および光線力学的抗微生物効果の比較研究)

Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology,
221, 112239, 2021

主指導教員：木内 良明教授
(医系科学研究科 視覚病態学)

副指導教員：坂口 剛正教授
(医系科学研究科 ウイルス学)

副指導教員：近間 泰一郎准教授
(医系科学研究科 視覚病態学)

宍道 紘一郎

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

広域抗生剤の多用によって、感染性角膜炎における多剤耐性菌の増加が問題となっている。光線力学的抗微生物化学療法（Photodynamic antimicrobial chemotherapy : PACT）は、抗生剤に依存しない治療として注目されている。PACTの原理は、光増感剤、光増感剤を励起する特定波長をもつ光、酸素の共作用により、細胞障害性のある一重項酸素を生成し微生物を障害することにある。これまで、我々は新規光増感剤 TONS504 を用いて種々の角膜炎起因微生物に PACT を行い、光線力学的抗微生物効果を確認してきた。しかし TONS504 の分子的特徴、すなわち光の吸収極大波長、溶液中での会合性、一重項酸素生成量は未検証だった。本研究の目的は、PACT に広く応用される光増感剤であるメチレンブルーとの比較を通して、TONS504 の分子的特徴を明らかにすることである。実験の前半では TONS504 とメチレンブルーの分子的特徴を比較し、後半では両物質の *Staphylococcus aureus*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Candida albicans* に対する抗微生物効果を比較することで、分子的特徴の差異が抗微生物効果にいかに関与するかも併せて考察した。なお、先行実験でメチレンブルーは TONS504 に近似した吸収極大波長をもつことが確認されており、比較対象として適切と考えた。

吸収極大および会合性の確認をするために TONS504 とメチレンブルーを PBS および 1% Triton X-100 含有 PBS (PBS/TX100) で希釈し、種々の濃度の溶液を作成した。界面活性剤である Triton X-100 を加えることで、溶液中での光増感剤の会合を抑制している。吸光度計を用いて、これらの溶液の吸収極大を計測した。

作成した種々の濃度の TONS504 とメチレンブルー溶液を、波長 664 nm の光で励起した。一重項酸素は 1270 nm 付近に燐光を発するため、同波長を検出し一重項酸素の生成量を求めた。

これらの実験の結果、TONS504 は 400-420 nm（ソーレー帯）および 665 nm（Q 帯）、メチレンブルーは 663 nm の波長に吸収極大を示した。PBS 中で TONS504 は、濃度をあげることでソーレー帯が短波長へ偏位した。この現象は TONS504 が高濃度で会合を生じていることを意味する。一方、メチレンブルーおよび PBS/TX-100 中の TONS504 は会合を起こさなかった。TONS504 のメチレンブルーに対する一重項酸素生成量の比率は、PBS 中で約 0.9 倍、PBS/TX-100 中で約 2.1 倍だった。

後半の実験では、抗微生物効果を判定するために TONS504 とメチレンブルーを、PBS を用いて種々の濃度に希釈した。それぞれの溶液 1 mL を、前培養の後に 1×10^7 colony-forming units (CFU) に調整した *S. aureus*、*P. aeruginosa*、*C. albicans* 菌液それぞれ 10 μ L と混合した。混合後、波長 660 nm の光を合計光量 30 J/cm² になるように持続照射し、照射後のそれぞれの溶液 100 μ L を寒天培地に播種した。暗所で培養後、形成されたコロニー数を計測した。形成されたコロニーが 300 CFU 以下であった場合を抗微生物効果ありと判定した。

その結果、TONS504 はメチレンブルーに比較して、*S. aureus* には 1/100 のモル濃度（それぞれ 9.0×10^{-2} 、9.0 μ mol/L）、*C. albicans* には 1/10 のモル濃度（それぞれ 9.0、90 μ mol/L）で

抗微生物効果を示した。一方で、両物質は *P. aeruginosa* に同じモル濃度（9.0 $\mu\text{mol/L}$ ）で抗微生物効果を示した。

本研究を通して、会合していない状態では TONS504 はメチレンブルーよりも高い一重項酸素生成量を持つことがわかった。一重項酸素の量は PACT の成否を左右する因子であり、後半の実験で *S. aureus* および *C. albicans* に対して TONS504 が低濃度で抗微生物効果を示したことの要因と考えられる。一方で、*P. aeruginosa* に対して両物質が抗菌効果を示した濃度に差がなかった。この要因として、*P. aeruginosa* の外膜を通過するには分子量の小さいメチレンブルーの方が有利だったため、一重項酸素の生成量の差を相殺した可能性がある。

分子的特徴として、TONS504 は高い会合性を持ち、一重項酸素生成を抑制することがわかった。界面活性剤などで会合を抑制すれば治療効果を高められる可能性がある。

本報告は TONS504 の分子的特徴を検証した初めての研究であり、今後の研究の基礎データとして重要である。