

東京医療保健大学大学院 医療保健学研究科 医療保健学専攻
学位論文 要旨

5-アミノレブリン酸類を用いた光線力学殺菌に関する研究

東京医療保健大学大学院
医療保健学研究科 医療保健学専攻
博士課程
領 域 名 感染制御学
学籍番号 HD021002
氏 名 牧野 亜樹子

背景 (Background)

抗菌薬が無効な薬剤耐性菌や複数の抗菌薬が無効な多剤耐性菌の出現が問題となっている。新規抗菌薬の開発が停滞していることから、抗菌薬に頼らない新たな殺菌方法の開発が求められている。そこで、がんの治療法の一つとして、光感受性を持つ色素に光を照射する時に生じる活性酸素種を用いてがん組織を死滅させる光線力学療法 (Photodynamic therapy: PDT) が注目されている。歯科分野では、口腔に存在する病原菌に対して PDT 治療が行われており、光線力学殺菌 (Antimicrobial photodynamic inactivation: aPDI) と呼称されている。最近、光感受性物質であるプロトポルフィリンIX (Protoporphyrin IX: PpIX) の前駆体である 5-アミノレブリン酸 (5-Aminolevulinic acid: 5-ALA) を用いた aPDI (5-ALA-aPDI) に関する研究として、*in vitro* 系での検討で 5-ALA-aPDI が黄色ブドウ球菌と緑膿菌に対して有効であることや、薬剤耐性菌の一つであるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA) に感染した皮膚潰瘍のマウスに対し 5-ALA を腹腔内に投与した後に創部に LED を照射するとバンコマイシン投与群の創治癒が促進したことが報告されている。5-ALA を用いた aPDI 効果に関する報告例は多いが、aPDI の抗菌スペクトルは明らかではなく、細胞内寄生菌に対する有効性の報告例はない。

目的 (Objective)

本研究では、抗菌薬を使用しない殺菌方法として aPDI に着目し、光感受性物質の前駆体であるアミノレブリン酸類として 5-アミノレブリン酸塩酸塩 (5-Aminolevulinic acid hydrochloride: 5-ALA·HCl) およびそのメチルエステル体であるメチル 5-アミノレブリン酸 (Methyl 5-aminolevulinic acid hydrochloride: Methyl-ALA) を用い、種々の細菌内で生合成された光感受性物質の aPDI 効果について検討し、臨床への応用の可能性を探索した。

方法(Methods)

使用菌株として、グラム陽性菌 8 菌株、グラム陰性菌 9 菌株、真菌 1 菌株を使用した。細胞にはマクロファージ様細胞である J774-1 細胞と THP-1 細胞を使用した。5-ALA·HCl、5-ALA·HCl を中和した 5-ALA·N、および Methyl-ALA は、ダルベッコリン酸緩衝溶液 (Dulbecco's phosphate buffered saline: D-PBS(-)) またはブレインハートインフュージョン (Brain heart infusion: BHI) 培地で約 1×10^9 CFU/mL に調整した菌懸濁液 900 μ L と 5-ALA·HCl、5-ALA·N、または Methyl-ALA 溶液 100 μ L を混合して一定時間暗所下でプレ培養後、

405 nm の LED 光を一定時間照射し、作用液の一部を寒天培地で 24 時間培養して生菌数を計測した。細菌内に蓄積されたポルフィリン化合物の質量分析測定には、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計 (Matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometer: MALDI-TOF MS) 用い、250~900 Da の範囲で測定を行った。

結果(Results)

細菌の中でも使用できる抗菌薬が限定されている細胞内寄生菌である *Listeria monocytogenes* に対する 5-ALA・HCl の aPDI 効果は、生菌数が検出限界値以下になるのに必要な LED 光照射時間は、ATCC15313 株と ATCC19115 株では 120 分間であったのに対し、ATCC19112 株と ATCC19113 株では 60 分間であった。*L. monocytogenes* に対して最適化した条件で、グラム陽性菌、グラム陰性菌、および真菌に対する aPDI 効果を検討すると、Methyl-ALA の方が 5-ALA・N を用いた場合より高い aPDI 効果を示した。また、培養直後、および 24 時間プレ培養後に LED 光照射を行った場合、グラム陰性菌よりグラム陽性菌の方が $3\log_{10}$ 以上の生菌数の減少が認められた。5-ALA・N または Methyl-ALA 共存下で培養すると菌種により 600~650 nm 付近の蛍光強度が増加し、ポルフィリン化合物が時間依存的に蓄積されることを確認した。質量分析測定により、*L. monocytogenes* や *Pseudomonas aeruginosa*、*Candida albicans* では、細菌内にポルフィリン誘導体と推定される化合物が生合成されていることが確認された。細胞内に寄生した *L. monocytogenes* に対する aPDI 効果は、いずれの細胞を用いても 60 分間の光照射で生菌数は検出限界値以下となった。

結論 (Conclusions)

5-ALA より親油性が向上したエステル体である Methyl-ALA の方が、aPDI 効果が高く、その効果は細菌内に蓄積されたポルフィリン化合物濃度に依存することが明らかとなった。また、グラム陽性菌の方がグラム陰性菌より 5-ALA 類の細胞内への取り込みまたは、代謝速度が早いことが示唆された。

キーワード (Key Words)

光線力学殺菌 (Antimicrobial photodynamic inactivation)、5-アミノレブリン酸 (5-Aminolevulinic acid)、メチル-5-アミノレブリン酸 (Methyl 5-aminolevulinate)、グラム陰性菌 (Gram negative bacteria)、グラム陽性菌 (Gram positive bacteria)、細胞内寄生菌 (Intracellular bacteria)