

耐性菌を作らない 新たなMRSA感染治療法

小澤俊幸、森本訓行、鶴田大輔

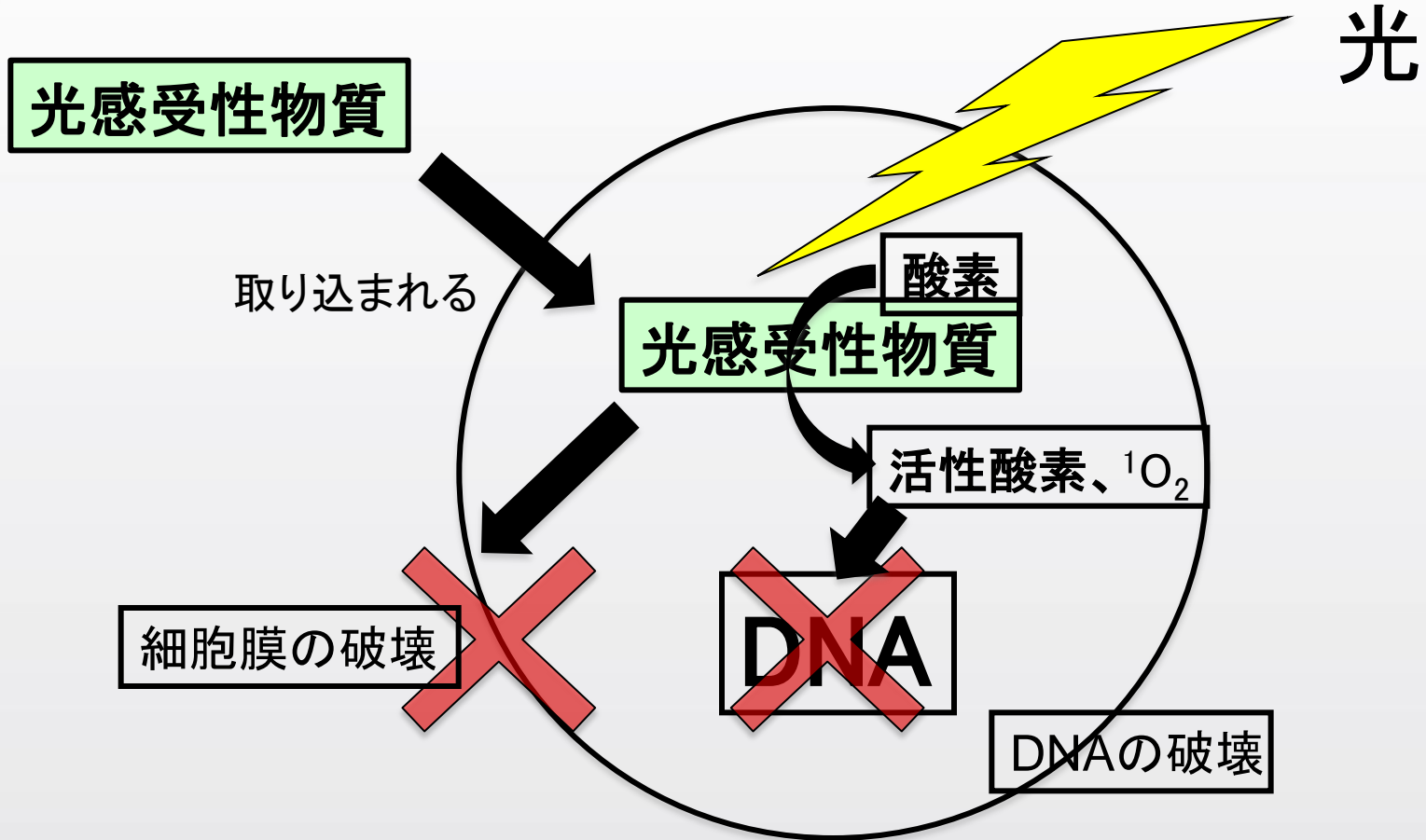
大阪市立大学大学院医学研究科 皮膚病態学



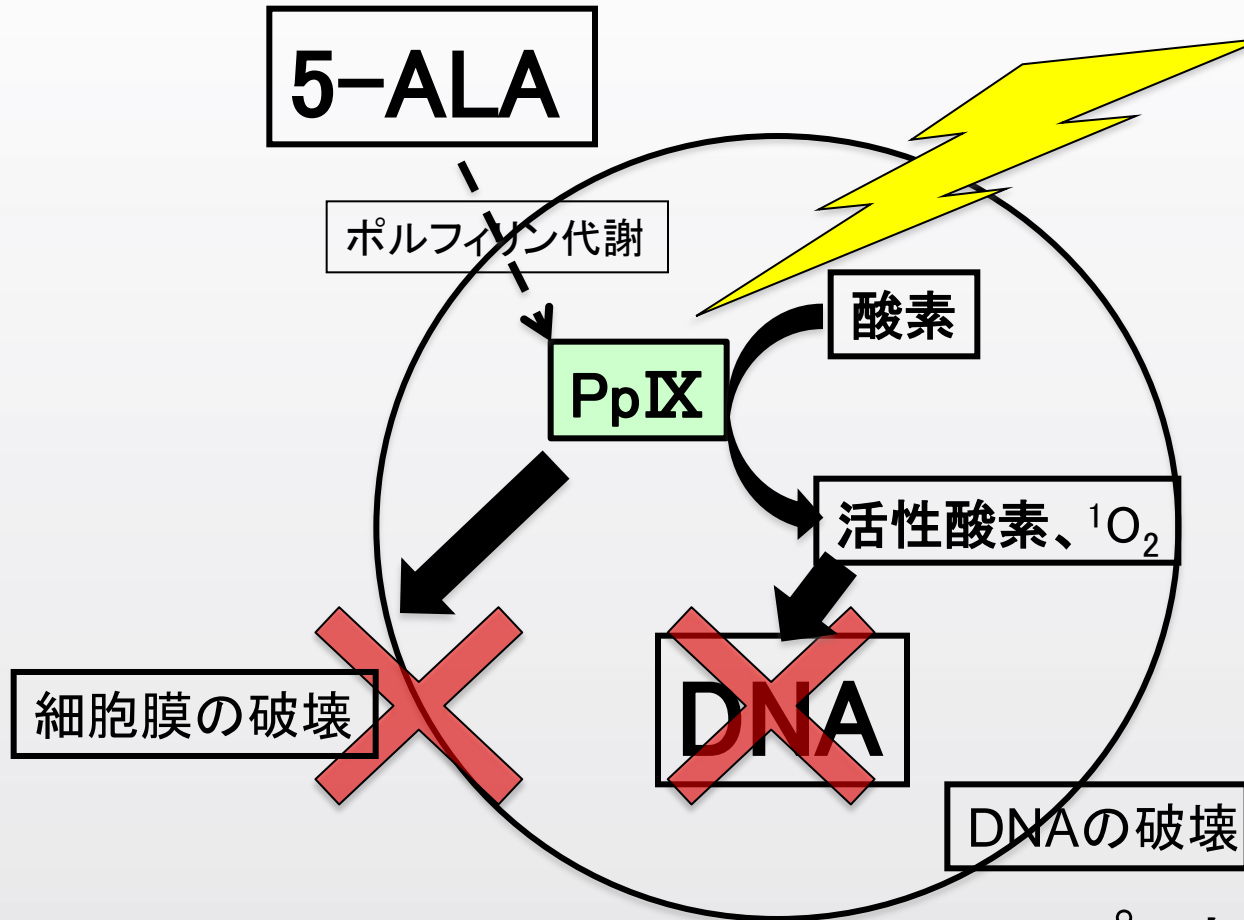
光線力学療法(PDT)

- PDTは光感受性物質に、ある特定の波長の光を照射することにより、細胞内に活性酸素を発生させ、選択的に腫瘍細胞を死滅させる治療法です。
- 現在、皮膚癌、子宮頸癌、肺癌、脳腫瘍などで臨床応用されている。
- PDTは抗腫瘍作用の他に殺菌作用も有しており、耐性菌を生じないとされている。

Photodynamic Therapy (PDT)



5-アミノレブリン酸 (5-ALA) のPDT



PpIX: プロトポルフィリンIX

5-aminolevulinic acid (5-ALA)

Porphobilinogen

Hydroxymethylbilane

Uoporphyrinogen I (UP I)

Uoporphyrinogen III (UP III)

Heme D1

Coproporphyrinogen I (CP I)

Coproporphyrinogen III (CP III)

Protoporphyrinogen IX

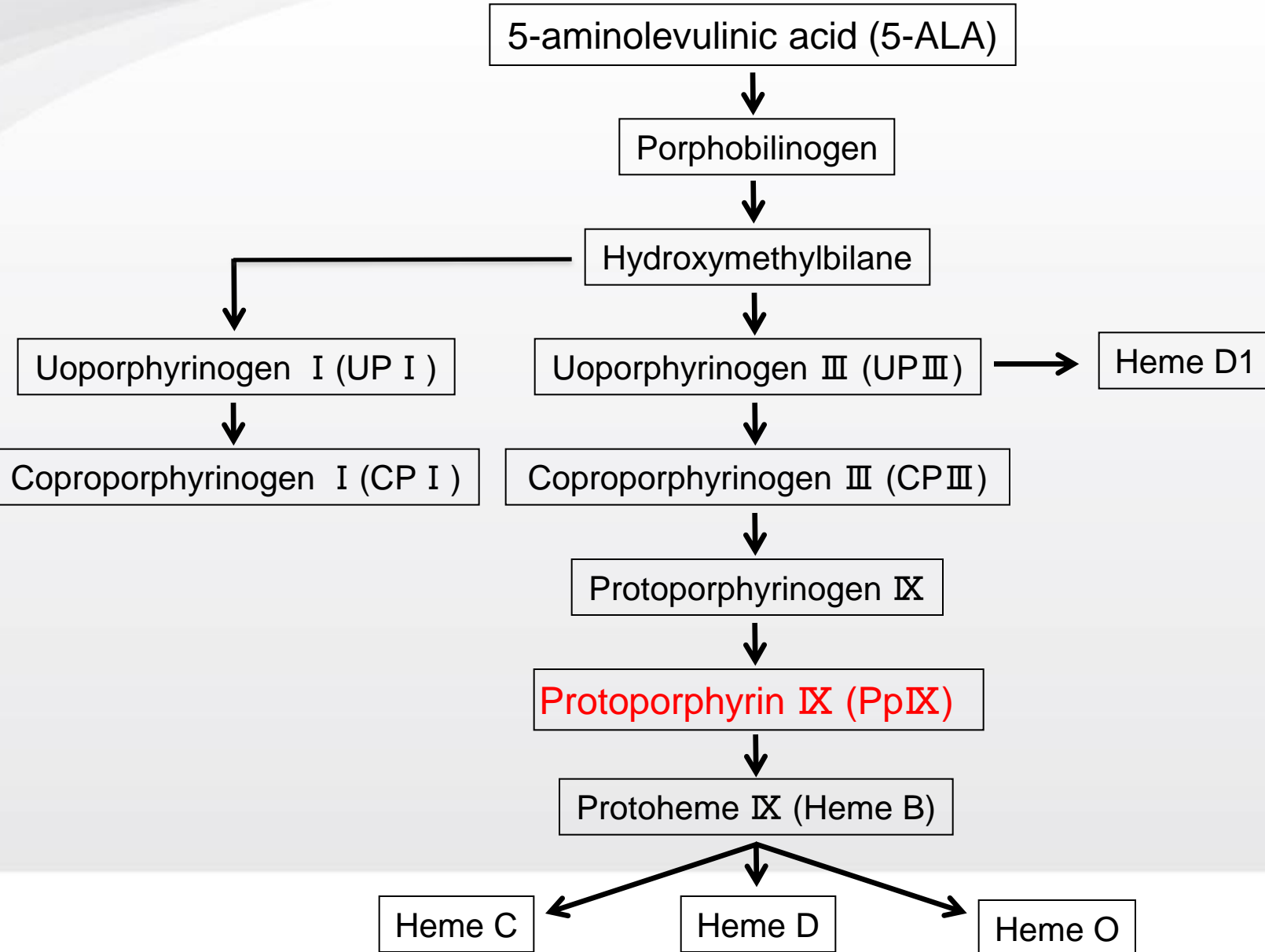
Protoporphyrin IX (Pp IX)

Protoheme IX (Heme B)

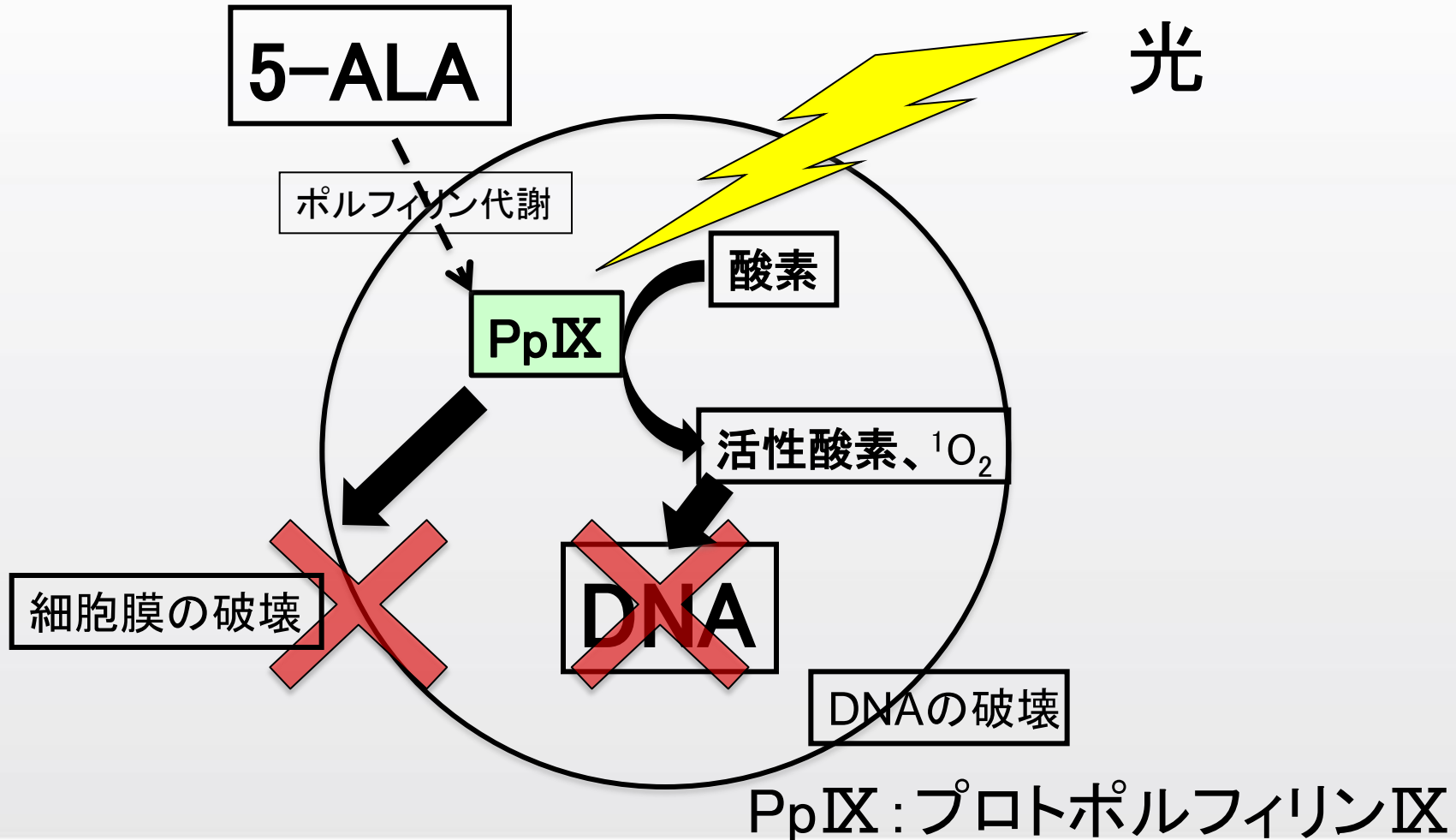
Heme C

Heme D

Heme O



5-アミノレブリン酸 (5-ALA) のPDT



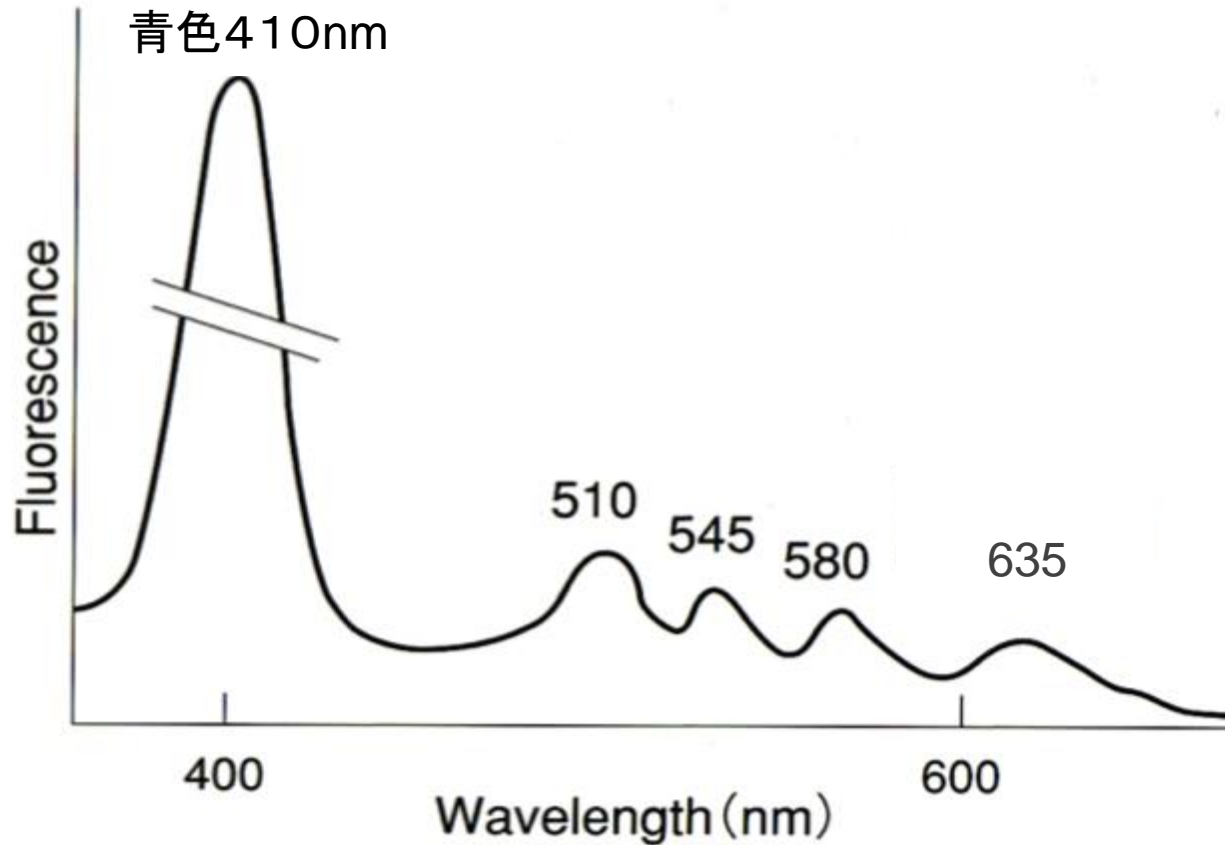
5-アミノレブリン酸の特徴

代謝経路が100%解明されているアミノ酸

健康食品にも添加されている

アラグリオ®内用剤として2013年3月承認

プロトポルフィリンⅨ (PpⅨ)の吸収スペクトル



プロトポルフィリンⅨの吸収スペクトル

光線力学療法(PDT)

- PDTは光感受性物質に、ある特定の波長の光を照射することにより、細胞内に活性酸素を発生させ、選択的に腫瘍細胞を死滅させる治療法です。

- 現在、子宮頸癌、肺癌、脳腫瘍、皮膚癌などで臨床応用されている。

- PDTは抗腫瘍作用の他に殺菌作用も有しており、耐性菌を生じないとされている。

皮膚悪性腫瘍のPDT



ボーエン病

Dye laser photodynamic therapy for Bowen's disease in a patient with epidermodysplasia verruciformis. Osaka City Med J. Ozawa et al.2012 Dec;58(2):77-

光線力学療法(PDT)

- PDTは光感受性物質に、ある特定の波長の光を照射することにより、細胞内に活性酸素を発生させ、選択的に腫瘍細胞を死滅させる治療法です。
 - 現在、子宮頸癌、肺癌、脳腫瘍、皮膚癌などで臨床応用されている。
- PDTは抗腫瘍作用の他に殺菌作用も有しており、耐性菌を生じないとされている。

全身熱傷などは感染のコントロールが出来なければ致死的となる。

特に多剤耐性菌が問題になる。



院内感染対策サーベイランス JANIS

- 平成19年4月に施行された改正医療法により、すべての医療機関において管理者の責任の下で院内感染対策のための体制の確保が義務化
- 院内感染対策サーベイランス(JANIS)は、参加医療機関における院内感染の発生状況や、薬剤耐性菌の分離状況および薬剤耐性菌による感染症の発生状況を調査し、我が国の院内感染の概況を把握し医療現場への院内感染対策に有用な情報の還元等を行うことを目的する。

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 MRSA

- 抗生物質メチシリンに対する薬剤耐性を獲得した黄色ブドウ球菌
- 実際は他の多くの抗生物質に対して耐性を持つ
- 多剤耐性菌の代表

目的

光感受性物質として5-アミノレブリン酸を、
光源として410 nmのLEDを用い、
MRSAに対するPDTの殺菌効果について
in vitro、*in vivo* において検討する。

in vitro

検証事項 (*in vitro*)

MRSAに対するPDTの条件

- ・殺菌効果の程度
- ・5-アミノレブリン酸の濃度
- ・照射出力

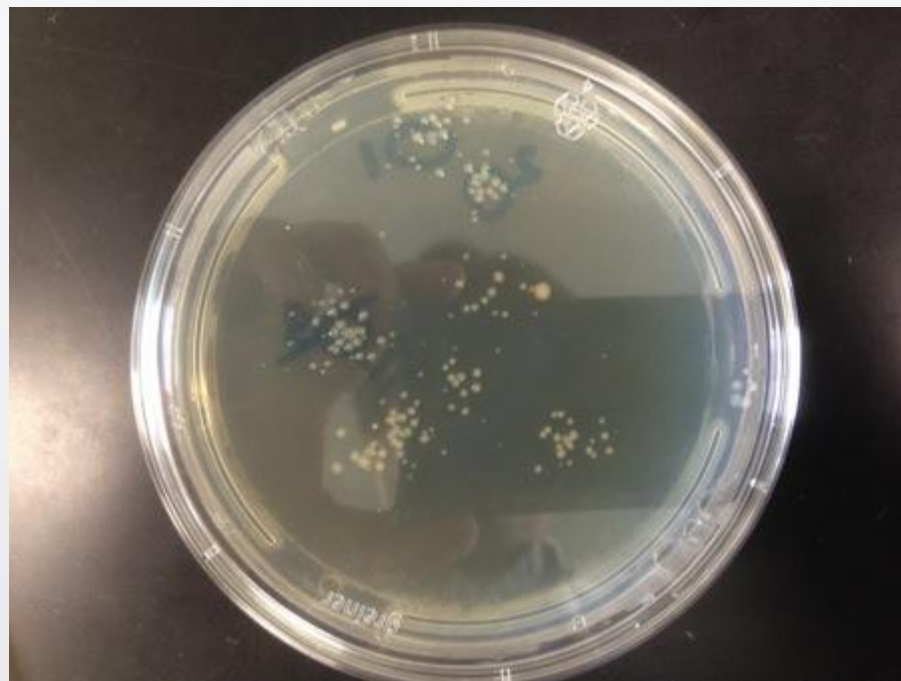
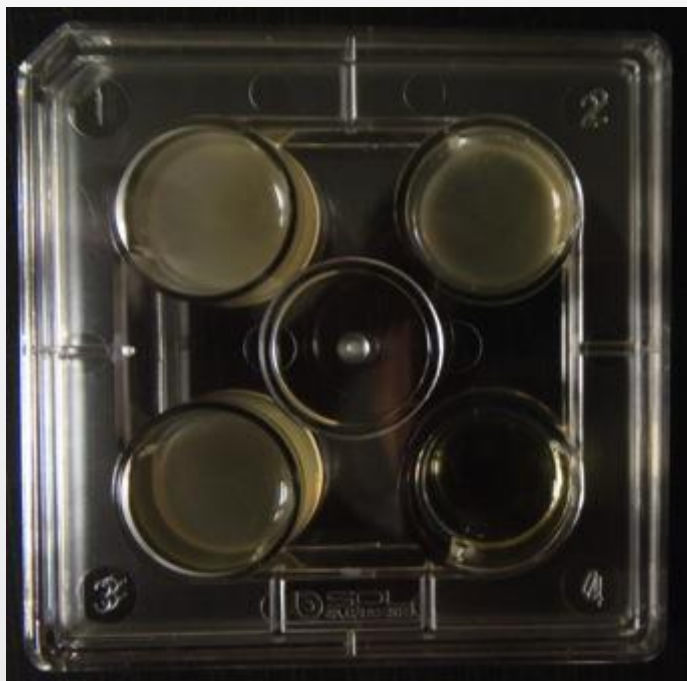
MRSAに対するPDTの条件

方法

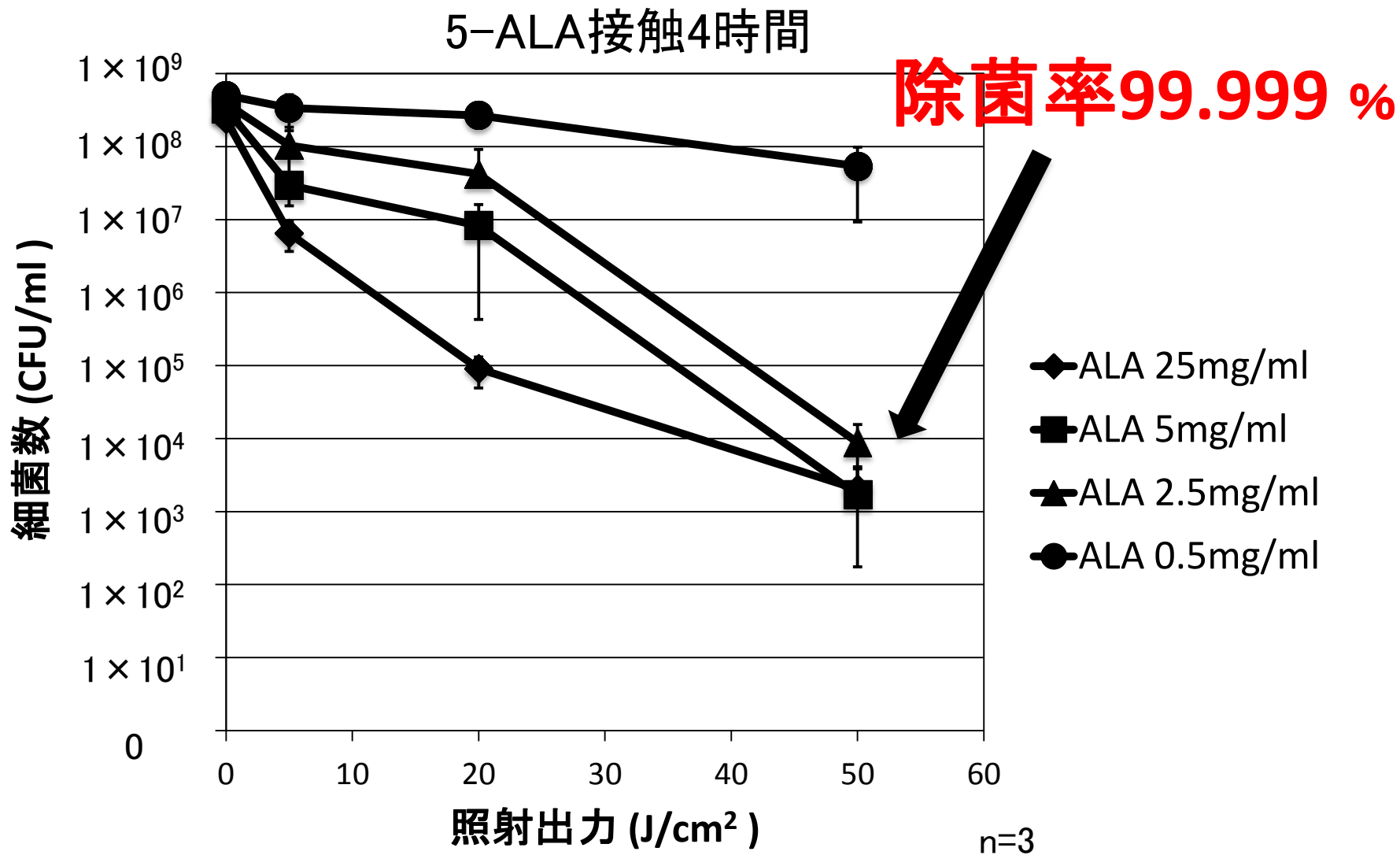
- MRSA(ATCC 33591)を液体培地に入れ、37°Cで24時間培養。
- 培養したMRSAの菌量を 10^8 CFU/mlに調整。
- **5-アミノレブリン酸**1~50 mg/ml(0.1~5%)に希釈し菌液に添加。
- 4時間後に青色LED(波長410 nm)を5, 20, 50 J/cm²で照射。
- CFUを測定。

ALA濃度、照射出力を検討

生菌数を測定



MRSAに対するPDT (5-ALA濃度、照射出力との関係)



MRSAに対するPDT (*in vitro*)

	今回のMRSAに 対するALA-PDT(<i>in vitro</i>)	臨床における悪性腫瘍に 対するALA-PDT
ALA濃度	0.25 %	20 %
照射出力	50 J/cm ²	50 ~ 150 J/cm ²
細胞毒性	なし	なし

→ *in vitro*で波長410 nmのALA-PDTは効果的
臨床応用へ向け*in vivo*で検証

in vivo

検証事項 (*in vivo*)

- ① MRSA感染皮膚潰瘍モデルの作成
- ② 5-ALAの投与経路
- ③ PDTのマウスMRSA感染皮膚潰瘍モデルへの効果
- ④ バンコマイシン投与との比較
- ⑤ 創部の菌量の比較

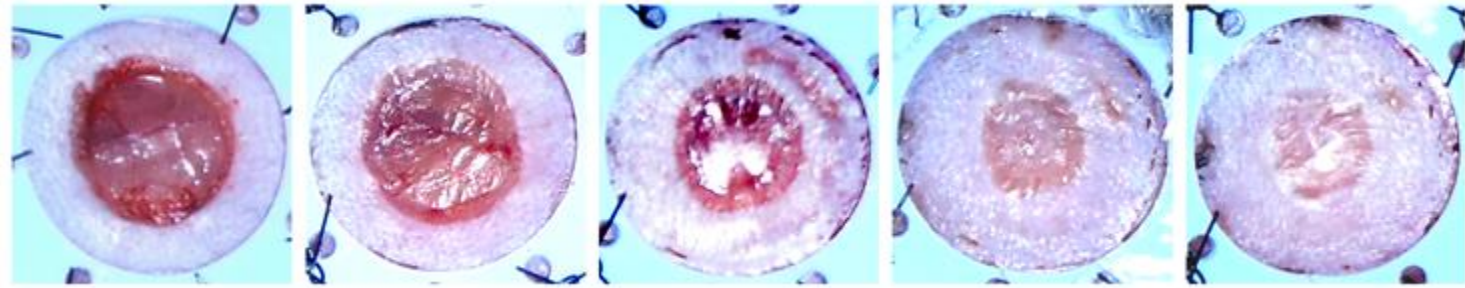
① マウスMRSA感染皮膚潰瘍モデル

- 成熟雄糖尿病マウス(C57BL/ksj db/db 8~10週齢)。
- 背部に直径6mmの全層皮膚欠損創を作成。
- 創面に 1×10^{10} CFUのMRSAを接菌。

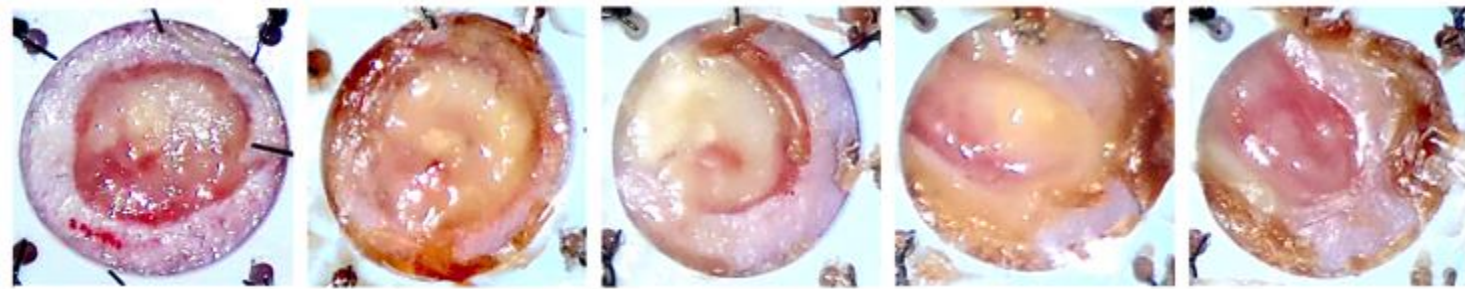


創の経過

正常潰瘍



MRSA感染モデル



Day 1

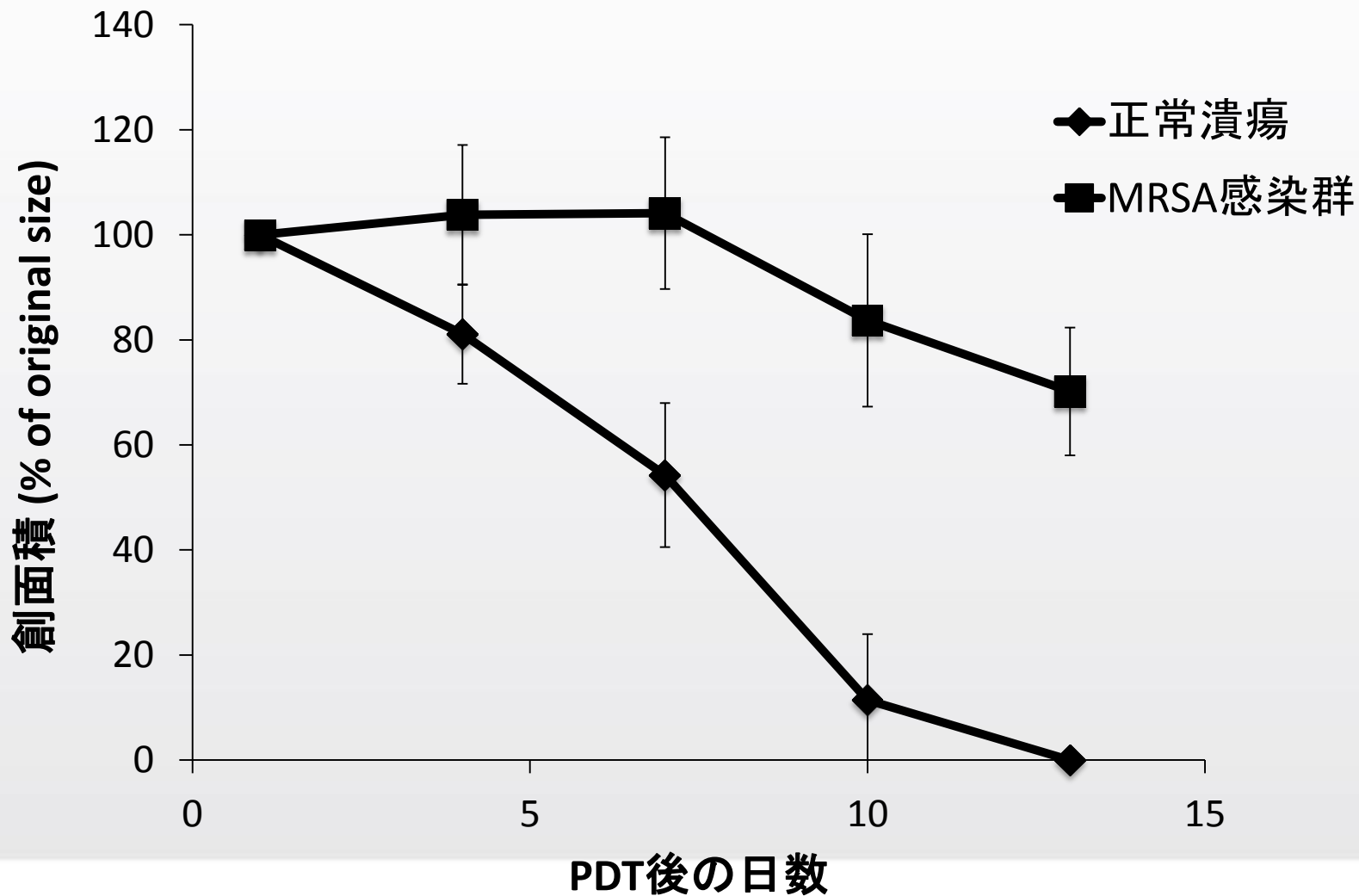
Day 4

Day 7

Day 10

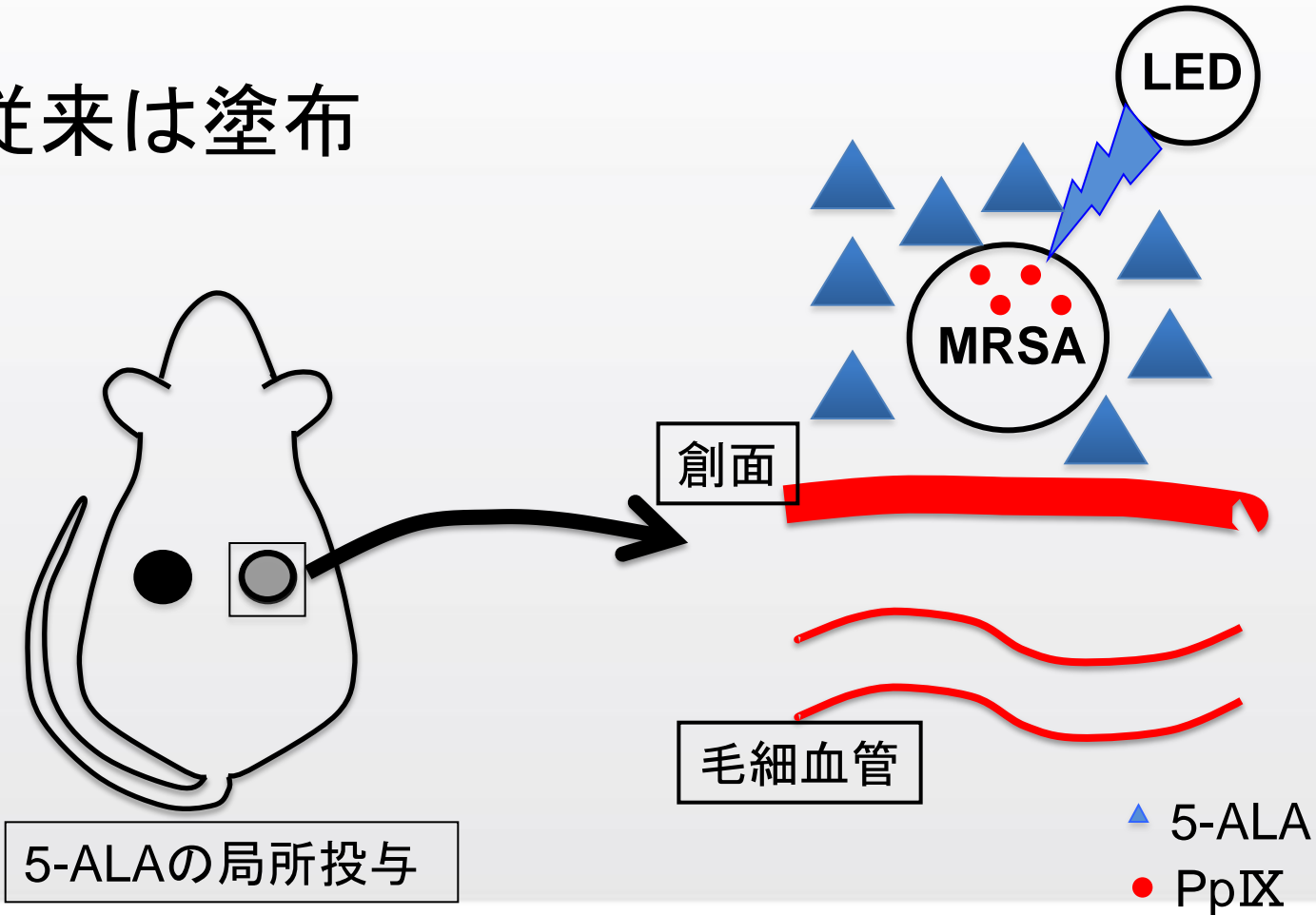
Day 13

創面積縮小率 (MRSA感染モデル)



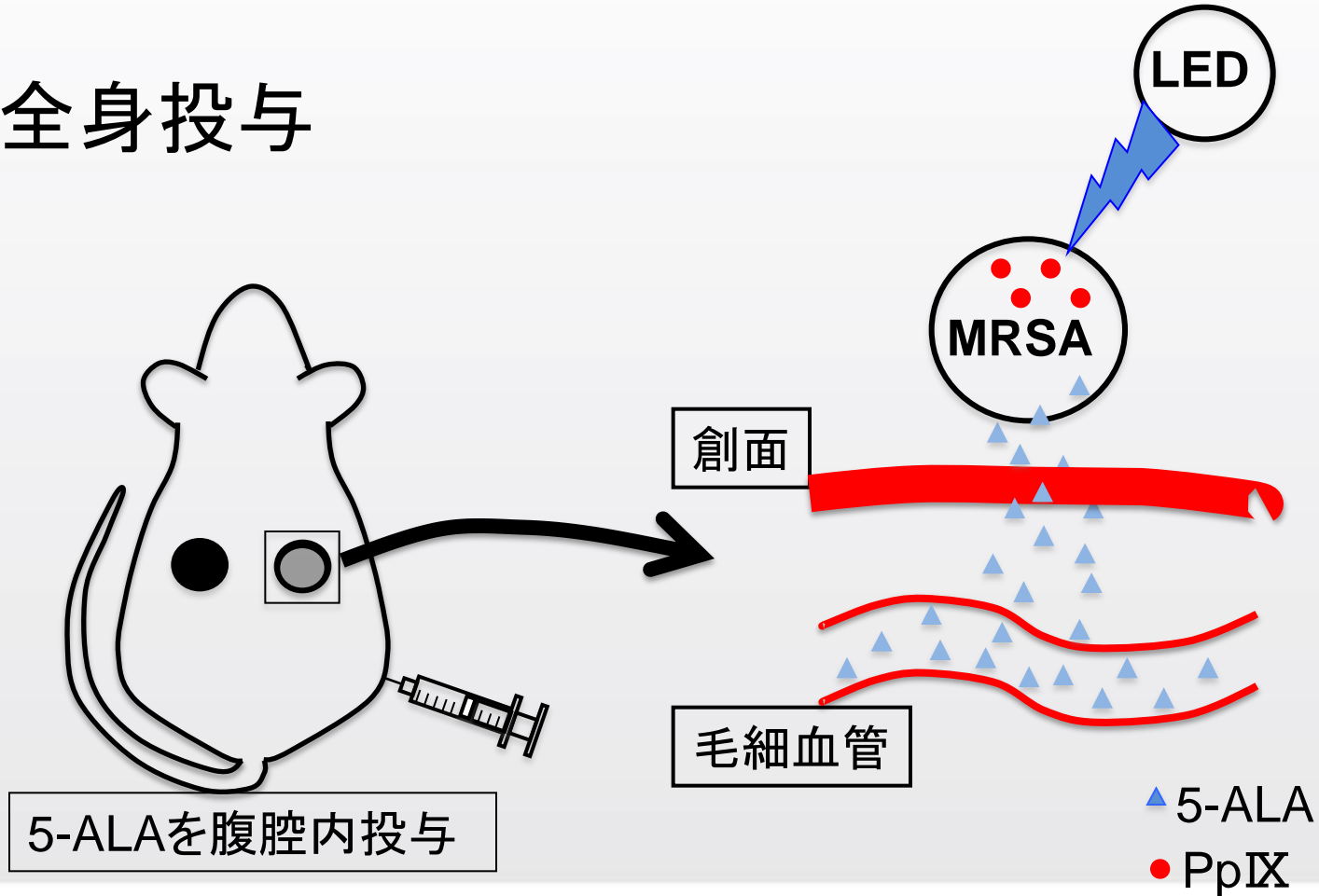
② 5-アミノレブリン酸の投与経路

従来は塗布

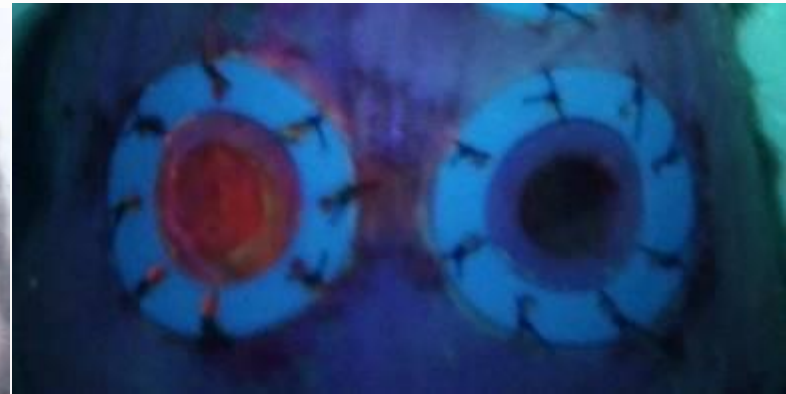
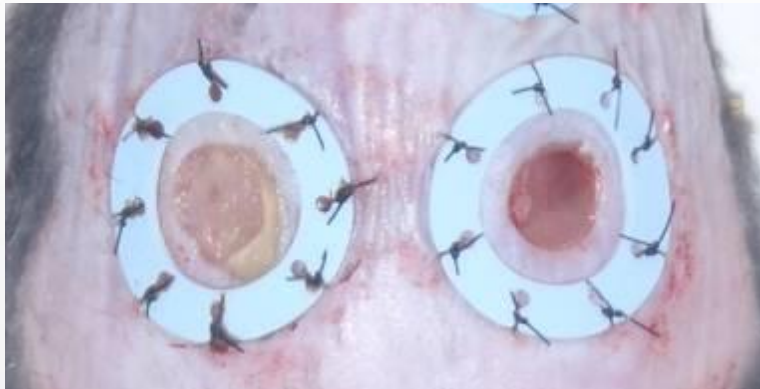


② 5-アミノレブリン酸の投与経路

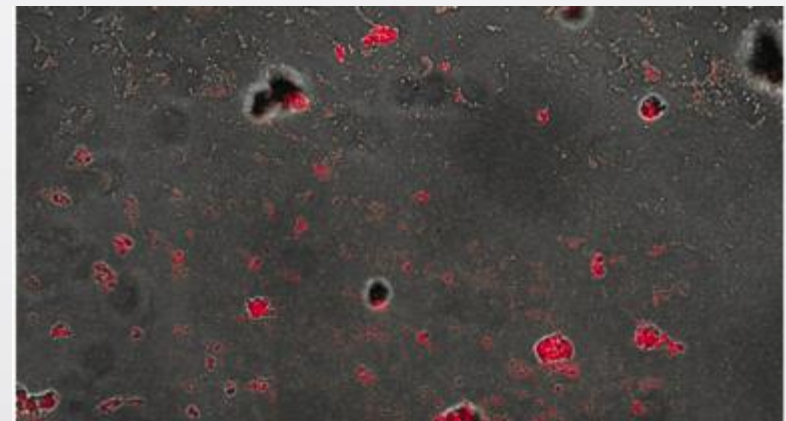
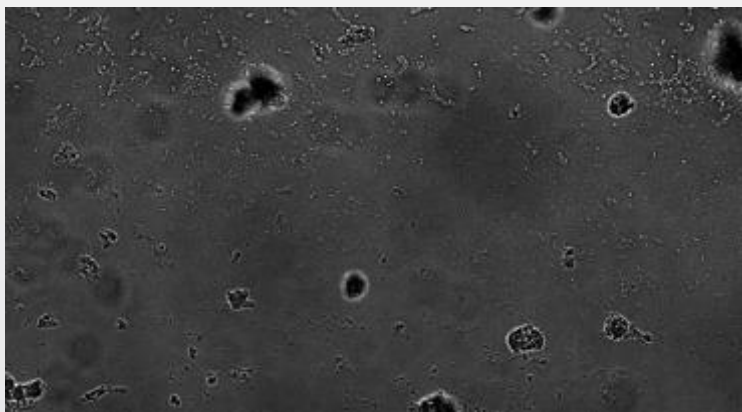
全身投与



腹腔内投与によるPpIXの蓄積



MRSA塗布48時間後、腹腔内に5-ALA 200 mg/Kgを投与し24時間後
ウッド灯を照射



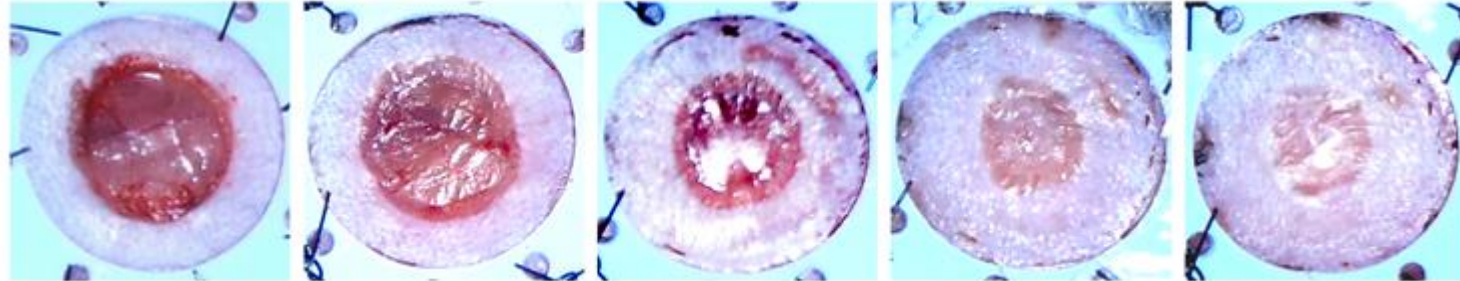
創面塗抹標本の共焦点レーザー顕微鏡画像
(405 Diode, UV. Emission bandwidth : 620 nm – 650 nm).

③ PDTの創傷治癒への影響

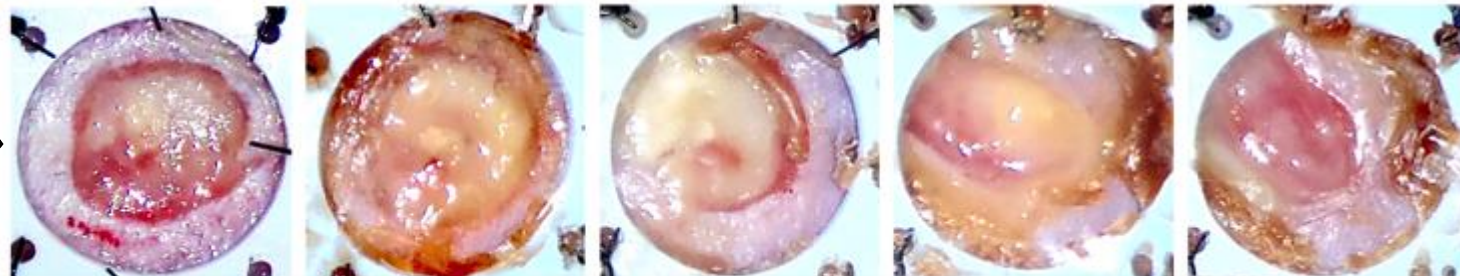
- ・マウスMRSA感染皮膚潰瘍モデル作成48時間後、腹腔内にALA 50 mg/Kg、 200 mg/Kg投与。
- ・24時間後、創面に波長410 nmのLEDを10、50 J/cm²で照射。
- ・再度ALAを投与し、24時間後にLEDを照射。

創の経過

正常潰瘍



MRSA感染モデル



PDT群
(5-ALA200mg/K
LED 50J/cm²)



Day 1

Day 4

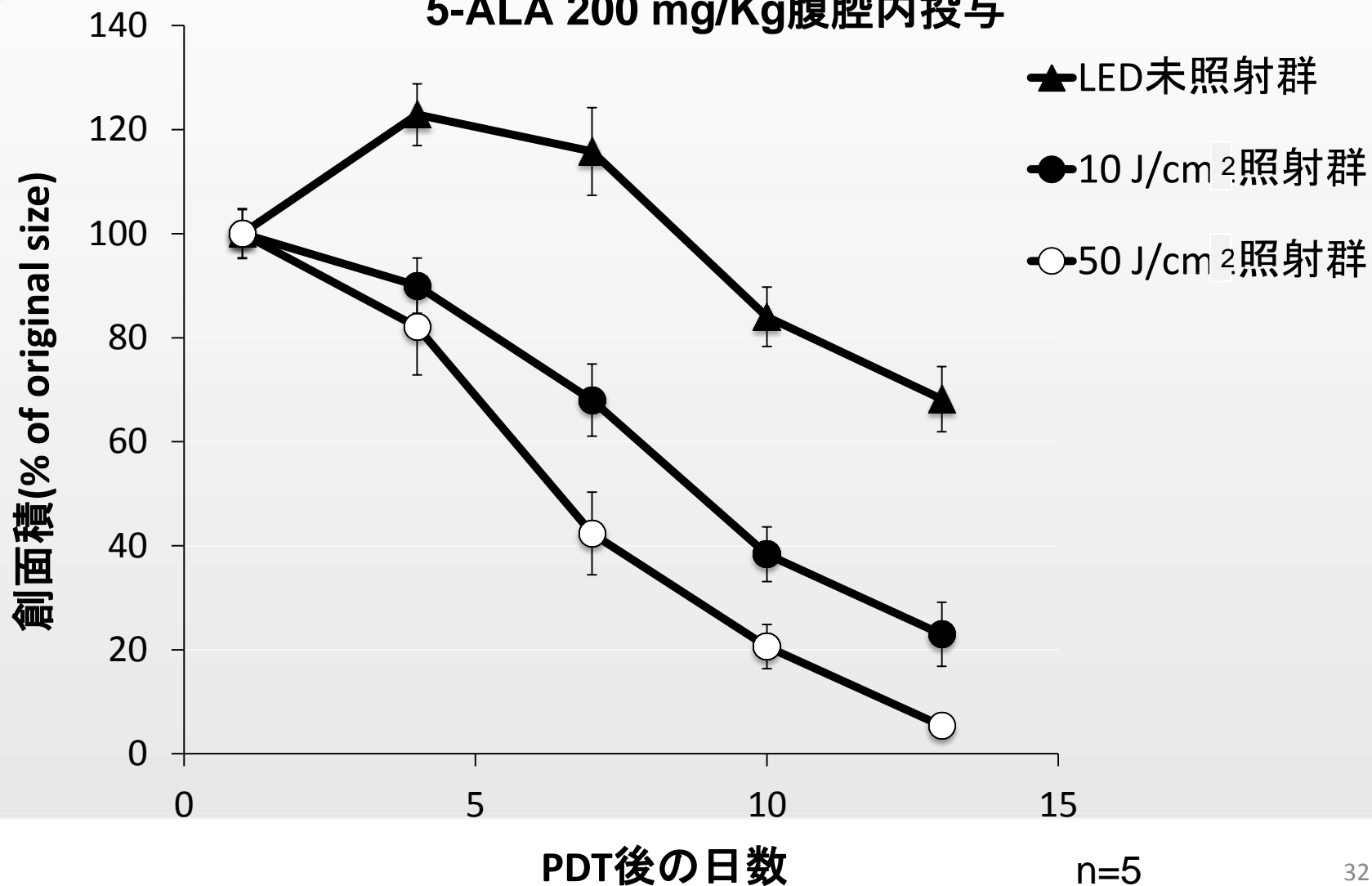
Day 7

Day 10

Day 13

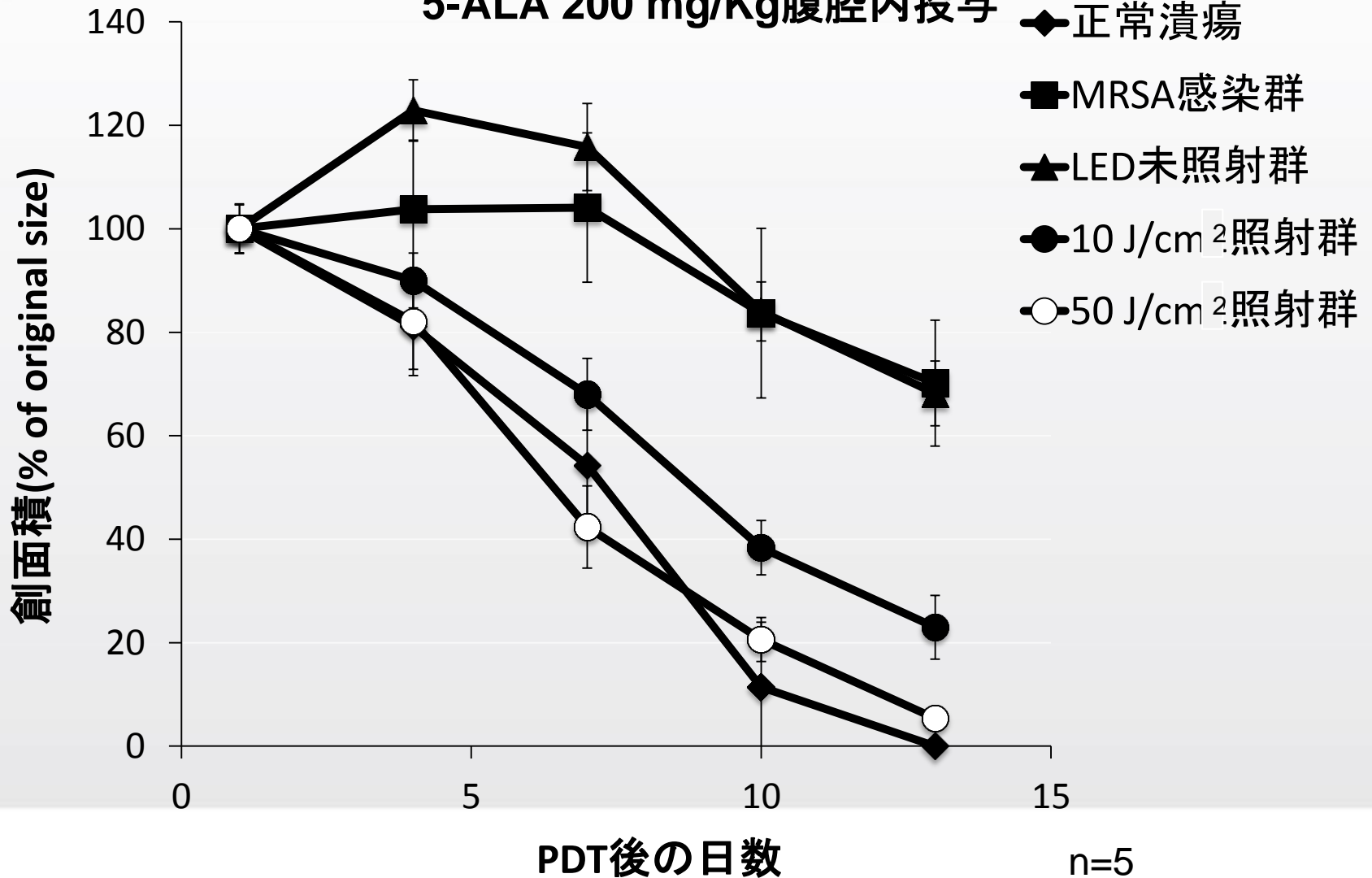
創面積縮小率

5-ALA 200 mg/Kg腹腔内投与



創面積縮小率

5-ALA 200 mg/Kg腹腔内投与



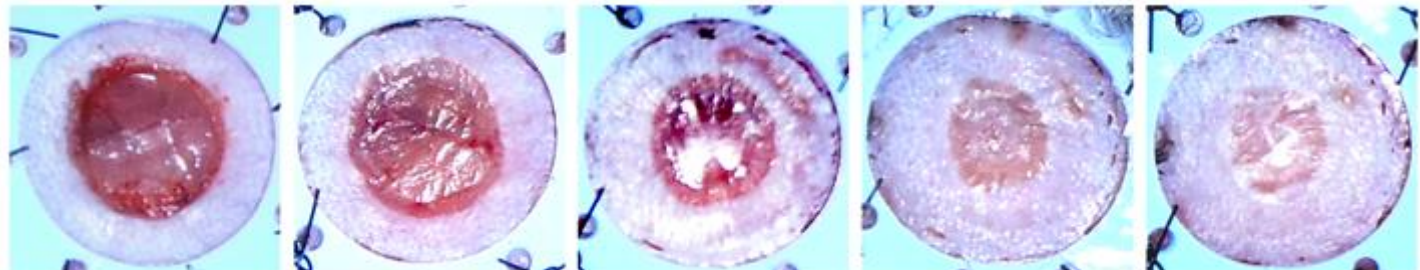
④ バンコマイシン (VCM) の効果

マウスMRSA感染皮膚潰瘍モデルに
VCM(110mg/Kg)を1日2回皮下注射。

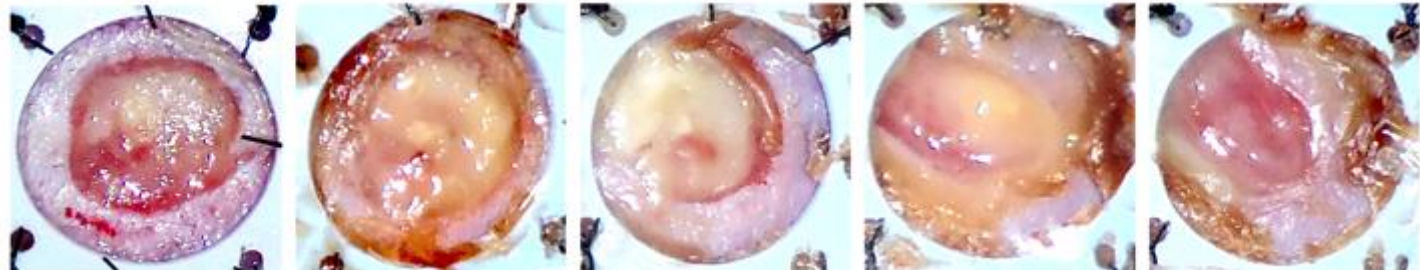
創の経過 (VCM投与群との比較)



正常潰瘍



MRSA感染モデル



VCM投与群



PDT群
(5-ALA200mg/K
LED 50J/cm²)



Day 1

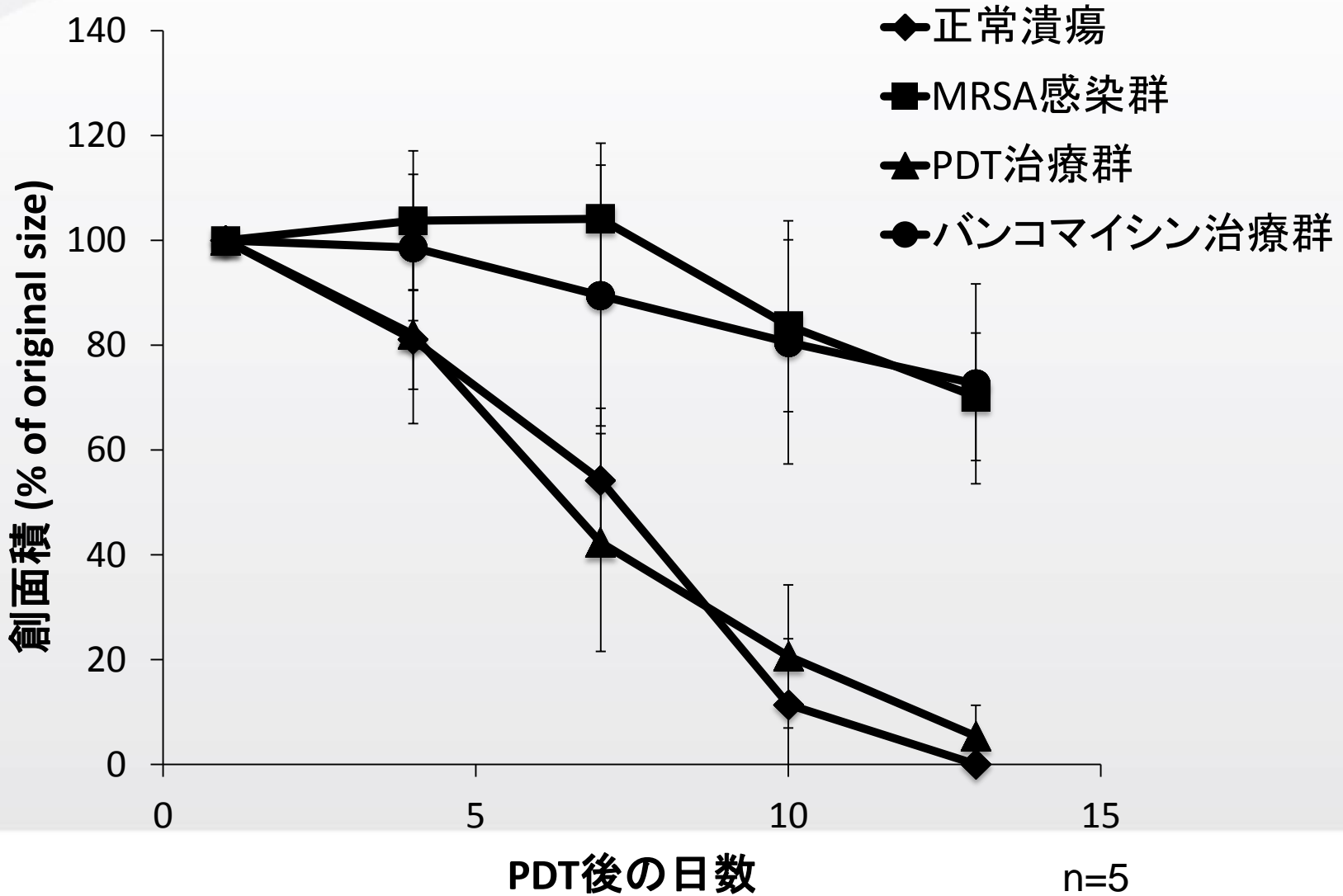
Day 4

Day 7

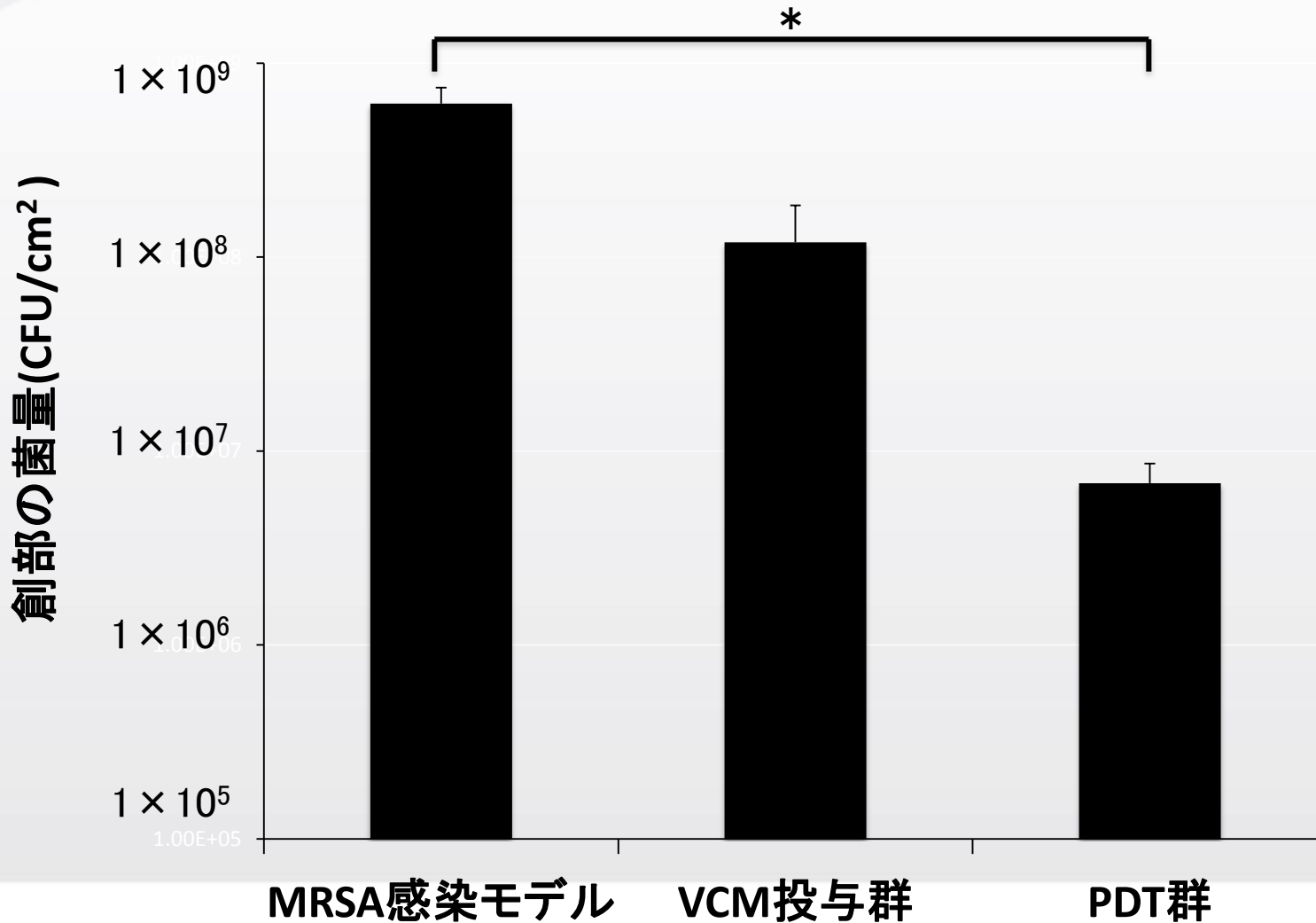
Day 10

Day 13

創面積縮小率 (PDT vs VCM)



創部の菌量の比較



*P < 0.01

まとめ

- ・5-ALAを用いたMRSAに対するPDTは十分な殺菌効果があった。
- ・5-ALAを腹腔内投与し、青色410nmLEDを照射するPDTは、MRSA感染皮膚潰瘍の創傷治癒を促進させた。
- ・5-ALAを用いたPDTは、MRSAによる創部感染に対して耐性菌を生じない、新たな治療法となる可能性があると考えられる。

今後の展望

- ・広範囲熱傷患者への感染成立前の予防的治療
- ・他菌種への応用
- ・他臓器への応用
- ・真菌への応用



ありがとうございました。