

平成30年 5月15日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20424

研究課題名(和文) プラーク染色剤を用いた新しいPACTの提案～訪問・在宅診療での応用を目指して～

研究課題名(英文) Bactericidal action of photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) with photosensitizers used as plaque disclosing agents

研究代表者

石山 希里香 (Ishiyama, Kirika)

東北大学・歯学研究科・教育研究支援者

研究者番号：20712904

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ローズベンガルなどの色素を光感受性物質に用いた光線力学殺菌療法(PACT)では、浮遊菌に対する殺菌効果は高いが、殺菌対象がバイオフィームとなると著しい殺菌力の低下が認められることが分かった。代わりに光感受性物質としてポリフェノールの一種であるカフェイン酸水溶液を用い、光源に近紫外線のLEDを用いる新しいPACTを応用した方法を試したところ、Streptococcus mutansのバイオフィームを効果的に殺菌することができた。ラットを用いた安全性試験にも問題はなかったため、後者の方が歯科応用に適していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The present study demonstrated that photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) using rose bengal as a photosensitizer was effective against planktonic bacteria. However, the antimicrobial activity against biofilm was considerably low. In contrast, antimicrobial chemotherapy based on UVA irradiation of caffeic acid aqueous solution showed high bactericidal effect against Streptococcus mutans biofilm. Caffeic acid is a kind of polyphenols and contained in various fruits and vegetables. This indicates that remaining caffeic acid after treatment may not be toxic when this antimicrobial technique is used in oral cavity. In addition, wounded skin irritation test using rats showed that the treatment did not deter the healing process. Therefore, it is suggested that the UVA irradiation of polyphenols be more suitable for dental application than PACT.

研究分野：医歯薬学

キーワード：PACT 光線力学療法 バイオフィーム 殺菌 ローズベンガル ポリフェノール カフェイン酸

## 1. 研究開始当初の背景

高齢者の口腔ケアは、高齢化社会において非常に重要な役割を担っている。近年、日本の総人口に占める高齢者の割合は年々増加の傾向にある。全身疾患と口腔内細菌の関連性が注目される中、高齢者の口腔ケアの重要性は明白である。自らの通院が困難な高齢者や、要介護で施設に入居している高齢者にとってはなおさらのことである。口腔内に常在する *Candida albicans* (*C.a*) は口腔カンジダ症や義歯性口内炎を引き起こす。全身疾患としては、誤嚥性肺炎や血行性カンジダ症（敗血症や心内膜炎など）の原因となる。*C.a* による日和見感染は、長期間の抗菌薬の使用、義歯や口腔内の清掃不良に起因し、特に義歯のレジン部は多孔質な材質やその使用環境ゆえ、細菌繁殖の温床となっている。治療には、抗真菌薬の投与や義歯や口腔内の正しい清掃が必須であるが、現在よく使用されている既存の化学消毒薬による義歯洗浄では、その効果が不十分である。よって家庭や施設でも応用可能な、簡便で確実な殺菌法が望まれている。

プラーク染色剤を用いた新しい光線力学殺菌療法（Photodynamic antimicrobial chemotherapy; PACT）は、従来法より格段に殺菌力が強い。PACT は、光増感剤の光励起を介して生成される一重項酸素の殺細胞効果を応用した治療法であり、ガン治療の分野で発展してきた（図1）。

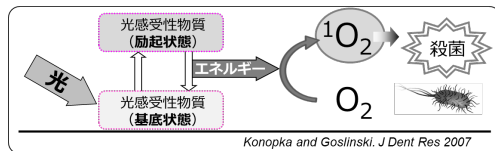


図1. PACTのコンセプト

歯科では、PACTの殺菌効果を利用し、歯内療法、虫歯治療、歯周病治療、インプラント周囲炎治療への応用が研究されてきている。カンジダ菌に対しても研究されているが、光増感剤としてメチレンブルー（MB）やトルイジンブルー（TBO）を用いた従来のPACTでは、殺菌力が弱く、臨床的效果が疑問視されているのが現状である。前述の問題を解消するため、代表者はプラーク染色剤に含まれるキサンテン系色素の光増感作用に着目し、新しいPACTの歯科応用を目標とした基礎的研究を行い報告してきた（石山ら 2012 PLoS ONE 7: e37871）。特に、キサンテン系色素のうちローズベンガル（RB）を光増感剤として用いたPACTは、短時間で非常に強力な殺菌効果を得られることを実証してきた。虫歯の原因菌である *Streptococcus mutans* (*S.m*) に対して、1分間の光照射で細菌数として5 log以上の殺菌効果を得られた。これを従来法と比較したものが図3であるが、MBやTBOと比べると格段に強い殺菌力であることが示されている。

我々の研究室では、菅野らによる過酸化水

素光分解殺菌法が研究されている（菅野ら Int J Prosthodont. 2012 Jul-Aug;25(4):376-80.）。そのシステムは青色光であるが、光源として緑色光と青色光を出す機器は可能であるため、本研究殺菌システムとのデュアル型とすることでより強力な殺菌力となる。実際に申請者は予備実験において、デュアル型システムでは単独型の3倍もの一重項酸素が生成されることを確認している。二つの波長を用いることで、今まで到達できなかったレジン多孔質部までデンチャープラークを殺菌することが可能だと考える。

また、家庭や施設で応用可能な簡便かつ確実に安全な殺菌法である。本殺菌法では、歯科臨床において日常的に使用されているプラーク染色剤を用いるため、生体安全性が担保できる。このように簡便かつ確実に安全な殺菌法ゆえ、訪問診療や在宅診療に応用可能である。このシステムの活躍の場は非常に多く、実際に患者の口腔ケアに貢献できることが、この研究の大きな意義である。

## 2. 研究の目的

高齢化社会が進んでいる現在、全身疾患との関連性の点からも高齢者への口腔ケアは非常に重要な地位にある。高齢者はしばしば、義歯や口腔内の清掃不良により *C.a* が繁殖する日和見感染症をおこす。現在歯科では口腔内細菌が原因の疾患に対して、PACTが臨床応用されているが、代表者はプラーク染色剤（キサンテン系色素）と緑色光という新しい組み合わせのPACTが従来法より格段に殺菌力が強いことを発見し実証してきた。そこで本研究は、*C.a* を含むデンチャープラークに対して新しいPACTを用いる義歯洗浄の臨床研究に向けた、基礎的データの集積を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験的バイオフィーム構築モデルの確立

*C.a* に先だって、比較的バイオフィームモデルを作製しやすいとされている口腔内細菌である *S.m* で実施し、*Streptococcus mutans* JCM 5705 を供試した。

前培養した *S.m* を1%スクロース含有 Brain Heart Infusion (BHI) 液体培地中に懸濁し、96 ウェル・マイクロプレートの底面を切削して作ったプラスチックプレートを置いた48ウェルに播種した。37℃で48時間の嫌気培養後、浮遊菌を洗浄除去し、ウェルの底面にあるプラスチックプレートに形成されたバイオフィームを走査型電子顕微鏡 (SEM; JXA-8500F, JEOL) で観察した。

バイオフィームの固定には前固定として2.5%(w/v)グルタルアルデヒドを用い、4℃の冷蔵庫でオーバーナイトさせた。翌日洗浄し、後固定として、2%(w/v)四酸化オスミウムを用い4℃で2時間固定した。その後アルコールで脱水し、t-ブチルアルコールを用い

て凍結乾燥装置 (JFD-320, JEOL) にて凍結乾燥した。最後に、オートファインコーター (JFC-1600, JEOL) にてプラチナコーティングを行った。

(2) 実験的バイオフィルムを対象とした PACT 殺菌試験および電解水を併用した PACT 殺菌効果の検証

プラーク染色剤にも用いられているキサンテン系色素のローズベンガル (RB)、エリスロシン (Ery)、フロキシシン (Phl) を光感受性物質として用いた。殺菌対象とする実験的バイオフィルムは、*S. m* を 1% スクローズ含有 BHI 液体培地中に懸濁し 96 ウェルに播種し、24 時間嫌気培養したものを供試した。これらの色素を生理食塩水、アルカリ性電解水 (pH: 11.5) あるいは酸性電解水 (pH: 2.5) に溶解し、実験的バイオフィルムを形成させたウェルに添加した。電解水は、0.075% の食塩水を強電解水生成器 (ALTRON MINI AL-700A, Altec) を用いて電解したものを供試した。光源は Nd-YAG レーザー第二高調波 (波長: 532 nm) を用い、実験的バイオフィルムと光感受性物質を含むウェルの全面が照射されるように上部から出力 60 mW (放射照度: 240 mW/cm<sup>2</sup>) で 3 分間 (43 J/cm<sup>2</sup>) 照射を行った。レーザー処理後にバイオフィルムを生理食塩水で洗浄した後、エーゼを用いて物理的にバイオフィルムをはがして懸濁液を作製し BHI 寒天培地に播種後 48 時間嫌気培養して生菌数を評価した。

(3) 実験的バイオフィルムを対象とした色素取り込み試験

前述の実験と同様の色素およびバイオフィルムを供試した。生成したバイオフィルムを生理食塩水で 2 回洗浄した後、遮光条件下で各色素を 3 分間インキュベートさせた。洗浄した後、プラスチック棒にてバイオフィルムを剥離させ、バイオフィルム懸濁液を 5,000 × g の条件で 5 分間遠心分離機にかけ、これを 3 回繰り返した。上清を破棄し 99.5% エタノールを入れ、ボルテックスに 3 分間かけることで色素を抽出させた。その上清の吸光度を測定した。

(4) ポリフェノールを光感受性物質として用いた PACT の殺菌試験

キサンテン系色素の代わりにポリフェノールの一種であるカフェイン酸 (CA) を用いた PACT 殺菌試験を行った。光源は 385 nm の LED を用い、対象となるバイオフィルムは前述と同様のものを供試した。

(5) ポリフェノールを光感受性物質として用いた PACT の生物学的安全性試験

事前に東北大学動物実験専門委員会の承認を得てから実験を行った。6 週齢の雄性 Wistar ラット (Charles River) を供試した。イソフルラン麻酔後、3 種混合麻酔 (塩酸メ

デトミジン 0.15 mg/kg、ミダゾラム 2.0 mg/kg、酒石酸ブトルフェール 2.5 mg/kg) を皮下注射し、直径 10 mm の円をラット背部に印記して外科用ハサミで皮膚を切除することで、全層皮膚欠損創を作製した。創傷部位に CA を播種し波長 365 nm の LED を、直径 12 mm レンズを用いて放射照度 275 mW/cm<sup>2</sup> で照射した。一日一回、創傷面積を計測し、治癒速度を純水を播種した場合や LED のみの場合と比較した。

4. 研究成果

(1) 実験的バイオフィルム構築モデルの確立 SEM 像を図 2 に示す。

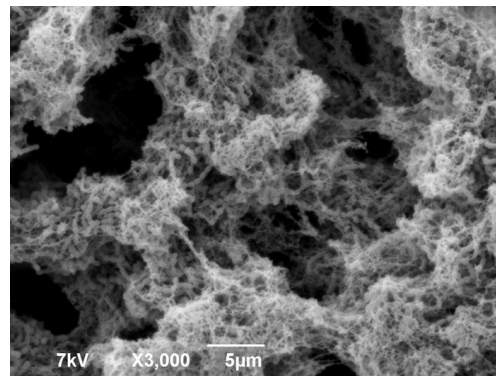


図2. 実験的S.mバイオフィルムのSEM像

細胞外マトリックスの形成とその中に存在する連鎖状の菌体を確認できたため、外部からの抵抗性を獲得したと考え、浮遊菌とは違う反応を示す実験的バイオフィルムを構築することができた。

(2) 実験的バイオフィルムを対象とした PACT 殺菌試験および電解水を併用した PACT 殺菌効果の検証

いずれの色素においても PACT によって 1 ~ 2 log 程度殺菌された。特に RB とアルカリ性電解水の併用で 3 log 以上の殺菌効果を認めた。(図 3)

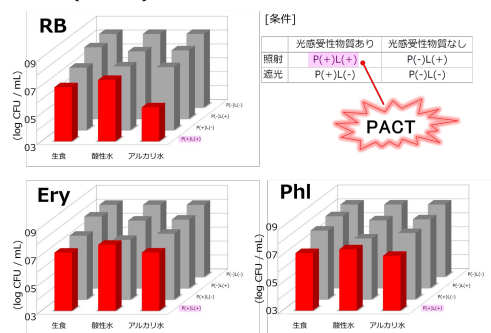


図3. 電解水併用PACT殺菌試験の結果

しかしながら、浮遊菌に対して得られた殺菌効果には届かず、バイオフィルムとなると著しい殺菌力の低下が認められることを確認した。

(3) 実験的バイオフィルムを対象とした色素取り込み試験

各色素の取り込み率は RB > Phl > Ery と

なり(図4) 殺菌試験とほぼ同様の結果が得られた。

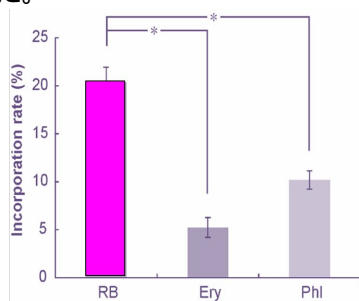


図4. 色素取り込み試験の結果 (\*は有意差あり)

(2)と(3)の結果を併せて考察すると、アルカリ性電解水によりバイオフィルムを形成する細胞外マトリックスが損傷を受け、菌体に対する親和性が高いRBが取り込まれやすくなったところで、PACTの殺菌活性が発揮されることが示唆される。

(4) ポリフェノールを光感受性物質として用いたPACTの殺菌試験

ポリフェノール的一种であるカフェイン酸を1mg/mLで光感受性物質に用いた場合もバイオフィルムに対する殺菌効果が発揮され、1分間の処理で3 log、2分間で5 logの生菌数の減少が認められた。LED照射を行わずにカフェイン酸だけで処理した場合、およびカフェイン酸のかわりに純水を使用して385 nmのLED照射を行った場合の生菌数の減少は、1 log未満であったことから殺菌効果はポリフェノールとLED照射の併用効果であることが分かった。(図5)

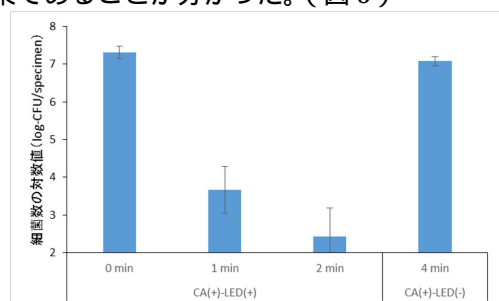


図5. カフェイン酸を用いたPACT殺菌試験の結果

(5) ポリフェノールを光感受性物質として用いたPACTの生物学的安全性試験

本研究は歯科応用を目的とするPACTの研究であるため、本殺菌法を訪問・在宅診療での口腔清掃方法として口腔内で使用することも想定して動物実験において安全性の検証を行った結果を図6に示す。

純水(PW)のみの群、純粋にLED照射を行った群(LED+PW)と結果に差異がなかったため、本PACTは創傷治癒に影響を及ぼさなかったことから安全性についても問題ないことが示唆された。

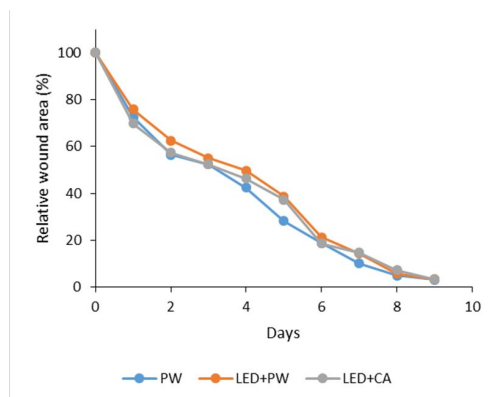


図6. 安全性(創傷治癒)試験結果

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

- (1) Kanno T, Nakamura K, Ishiyama K, et al (11人中3番目), Adjunctive antimicrobial chemotherapy based on hydrogen peroxide photolysis for non-surgical treatment of moderate to severe periodontitis: a randomized controlled trial, Scientific Reports, 査読有、7(1)巻、2017、12247  
DOI: 10.1038/s41598-017-12514-0
- (2) Ishiyama K, Nakamura K, Kanno T, Niwano Y, Bactericidal Action of Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (PACT) with Photosensitizers Used as Plaque-Disclosing Agents against Experimental Biofilm, Biocontrol Science, 査読有、21(3)巻、2016、187-191  
DOI: 10.4265/bio.21.187

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

石山 希里香 (ISHIYAMA, Kirika)  
東北大学・大学院歯学研究科・教育研究支援者  
研究者番号：20712904