

令和元年6月13日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11572

研究課題名(和文) 抗菌光線力学療法を応用した新たな象牙質消毒法の開発

研究課題名(英文) Development of new dentin disinfection method applying antibacterial photodynamic therapy

研究代表者

樋口 直也 (Higuchi, Naoya)

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号：10329609

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)：本研究では、インドシアニングリーンを封入したナノ粒子と半導体レーザーを用いた抗菌光線力学療法による新たな象牙質消毒法を開発することを目的とし、歯内療法への応用を検討とした。難治性根尖性歯周炎の根管から高率に検出される *Enterococcus faecalis* に対する殺菌性の有無を調べ、レーザー照射条件の影響を調べた。その結果、浮遊状態でもバイオフィーム状態でも有意な殺菌効果が認められた。また、照射出力および時間の増加に伴い、殺菌効果が増大することが明らかになった。しかし、同時に歯根表面の温度も上昇することが明らかになり、臨床応用の検討時、照射条件設定の際に考慮しなければならないと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、歯の根の中を掃除するときに使用している薬剤は強い殺菌力を持っているが、使用法を間違えると人体にも危険を及ぼす。そのため、殺菌力が高く、安全な消毒法の開発が急務である。現在、色素を細菌に付着させ、光を当てることで殺菌する方法が注目されており、今回、安全性が認められているインドシアニンググリーンという色素をナノ粒子にして、細菌に付着させ、レーザー光を照射するという方法で、歯の根の消毒に用いることができるかを検討した。その結果、殺菌性が確認でき、レーザーの出力や時間などの照射条件により、その効果が変わることが分かったが、同時に歯の根の温度が上昇するため、臨床応用にはさらなる検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：In this study, I aimed to develop a new method for disinfecting dentin with antibacterial photodynamic therapy using nanoparticles with indocyanine green and semiconductor laser and examined the application to Endodontics. The presence or absence of bactericidal activity against *Enterococcus faecalis* detected in the root canal of intractable apical periodontitis was investigated and the effects of laser irradiation conditions were investigated. As a result, significant bactericidal effects were observed both in the floating state and in the biofilm state. Moreover, it became clear that the bactericidal effect increased with the increase in irradiation output and time. However, it was revealed that the temperature of the root surface also increased at the same time. Therefore, it was thought that it should be taken into consideration when setting irradiation conditions for considering clinical application.

研究分野：歯内治療

キーワード：抗菌光線力学療法 歯内治療 インドシアニンググリーン封入ナノ粒子 半導体レーザー *Enterococcus faecalis*

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯内療法の目的は、細菌を歯内から除去することと、再感染を防止することである。根管内および象牙質内に残存する細菌は根管治療の成否を左右することが知られており、感染根管治療や再根管治療において根管内および象牙質内をできるだけ無菌的にすることが求められている。また、将来期待されている歯髄の再生治療においても無菌的根管が必要であると考えられており、安全で、より確実な殺菌方法の開発が望まれている。根管治療において、機械的な清掃のみによる除菌では不十分といわれており¹⁾²⁾、それを補うために化学的清掃剤が用いられている。現在、化学的清掃剤として次亜塩素酸ナトリウムが最も広く使用されている²⁾が、比較的高濃度で使用するため、人体への危険が伴い、医療事故が報告されている³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾。

一方、近年、医科領域で光線力学療法と呼ばれる治療法が開発され、臨床に応用されている。これは、単独では生体にほぼ無害と考えられる光感受性物質と、その物質を特異的に励起させる波長の光を組み合わせることによって、選択的にエネルギーを組織局所に集中させる治療法で、主に癌治療に用いられている。標的となる組織を細菌にすることで、生体への組織障害を避け、選択的に殺菌が可能になる。細菌を標的因子とした光線力学療法は、抗菌光線力学療法 (aPDT) と呼ばれ、歯科では主に歯周病治療において先行して研究が行われてきた⁷⁾⁸⁾。現在、歯内療法領域においても基礎的な研究が進められており、臨床応用が検討されているが、光感受性物質の種類、光源の種類や強度、作用時間などさまざまな条件下で行われており⁹⁾¹⁰⁾、根管という特殊な環境 (硬組織に囲まれた狭く複雑な根管系) という条件もあり、至適条件についていまだに統一見解が得られていない。

本研究で基本的な知見を得て、根管の化学的清掃に代わる安全でより確実な清掃法、および象牙質齶蝕治療への臨床応用を検討する。

2. 研究の目的

本研究は、歯内療法において、光線力学療法を応用し、安全でより確実に、根管内および象牙質内に残存する細菌の新たな殺菌方法を確立し、その臨床応用を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) *Enterococcus faecalis* の培養曲線と菌数の関係

菌株には、難治性根尖性歯周炎の根管から高率に検出される *Enterococcus faecalis* ATCC19433 を使用した。BHI 培地で 37℃、嫌気条件下で培養を行った。増殖状態を吸光度計 (OD600nm) で経時的に測定し、増殖曲線を作成した。0.1 のときに存在する細菌数を確認するために、段階希釈法により、希釈した菌液を寒天培地に摂取し、培養後にコロニー数をカウントして、総菌数を算出した。

(2) 浮遊状態の細菌に対する殺菌性に関するレーザーの照射条件の検討

光感受性物質として、市販されているインドシアニングリーン (ICG) を用い、研究協力者である三谷章雄教授らの報告¹¹⁾に従い、ICG ナノ粒子の作製を行った。つまり、生体内分解性・生体適合性高分子であるポリ乳酸グリコール酸共重合体 (PLGA) を基剤とし、ICG を封入したナノ粒子を油中エマルジョン溶媒拡散法により調整した。その後、ナノ粒子表面をカオチン性ポリマーであるキトサンで表面修飾した。さらに、凝集防止剤としてマンニト

ールを添加した。凍結乾燥を行い、ICG ナノ粒子を作製した。

滅菌マイクロ遠心チューブに *E. faecalis* の菌液 (1.0×10^8 CFU/ml) 100 μ l を摂取し、調製した ICG ナノ粒子溶液を同量添加した(終濃度 10mg/ml)。実験群の試料において、半導体レーザーの照射条件を、時間(1, 3, 5 分間) 出力(0.7, 1.4, 2.1W) いずれも RPT モード: Duty cycle 50%, 100ms) とした。レーザー照射(図 1)後、段階希釈法により、前述のようにコロニー数をカウントして、総菌数を算出した。

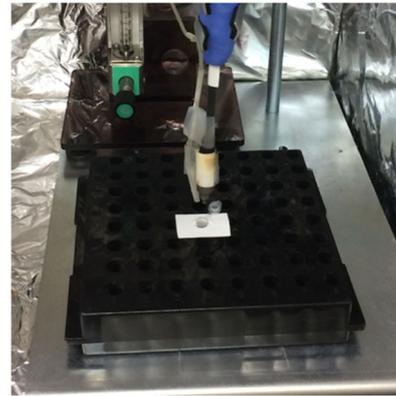


図 1 浮遊細菌へのレーザー照射

(3) 温度変化を指標とした歯周組織への安全性に関するレーザーの照射条件の検討

抜去されたヒト下顎小白歯の歯冠の 2/3 を切断除去し、規格性をもたせて、60 番まで根管形成した。aPDT 中の歯根表面の温度変化をサーモグラフィカメラで計測した(図 2)。コントロールとして生理食塩水を用い、比較を行った。レーザー照射条件は、出力 0.7, 1.4, 2.1W (RPT モード: Duty cycle 50%, 100ms)で 5 分間測定した。

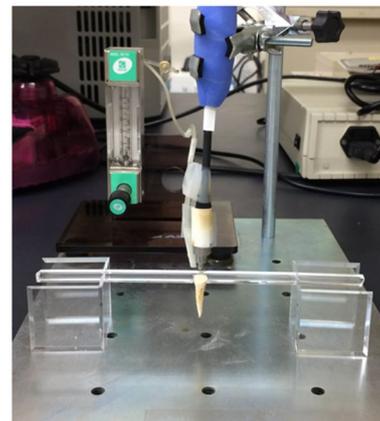


図 2 歯根表面の温度変化の測定

(4) バイオフィルムを形成した細菌に対する殺菌性に関するレーザー照射条件の検討

抜去されたブタの歯根を用いて、規格性をもたせて 60 番まで根管形成した。次亜塩素酸ナトリウムと EDTA を用い、化学的清掃を行った後に、オートクレーブにより滅菌した。その後、PCR チューブに即時重合レジンで固定し、*E. faecalis* を根管内に感染させた。2 日間に 1 回、培地交換を行いながら、3 週間培養してバイオフィルムを形成させ、感染根管モデルを作製した(図 3)。実験群には ICG ナノ粒子溶液とレーザー照射で aPDT を行い、生理食塩水で洗浄し、ペーパーポイント(55 番)で乾燥、釣菌した。段階希釈法で前述のようにコロニー数をカウントし、総菌数を算出した。



図 3 感染根管モデル

4. 研究成果

(1) *E. faecalis* の培養曲線と菌数の関係

E. faecalis の増殖状態を吸光度計で経時的に測定し、増殖曲線を作成した(図4)。対数増殖期内の培養開始から2~3時間経過時に濁度(600nm)が0.1となることが分かった。また、段階希釈後のコロニーカウントにより、0.1の値の際に、菌数が約 1.0×10^8 CFU/ml となることが確認された。

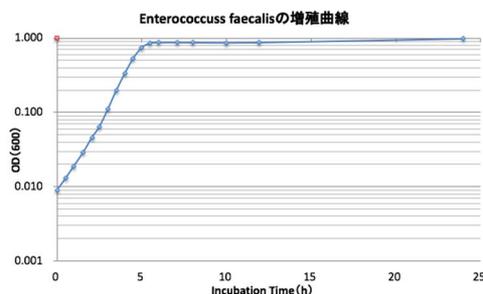


図4 *E. faecalis* の増殖曲線

(2) 浮遊状態の細菌に対する殺菌性に関するレーザーの照射条件の検討

ICG ナノ粒子を作製し(図5) まず、aPDTによる殺菌効果を確認するために、レーザー照射を行わない ICG ナノ粒子のみの群と、ICG ナノ粒子を用いないレーザー照射のみの群と比較した。aPDT 群においてのみ、検出細菌数の有意な減少が認められ、殺菌効果を示した(図6)。



図5 ICGナノ粒子

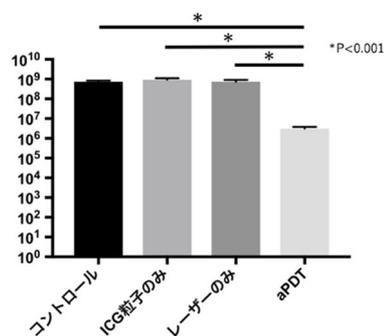


図6 aPDTによる殺菌作用の確認

次に、レーザー照射時間の殺菌効果への影響を調べた。その結果、照射条件を出力0.7W、RPTモード(Duty cycle 50%, 100ms)に設定した場合、1分以上の照射により、検出細菌数の有意な減少を認めた(図7)。また、3分間以上の照射ではさらに顕著になり、照射時間依存的に検出細菌数の減少が認められた(図7)。

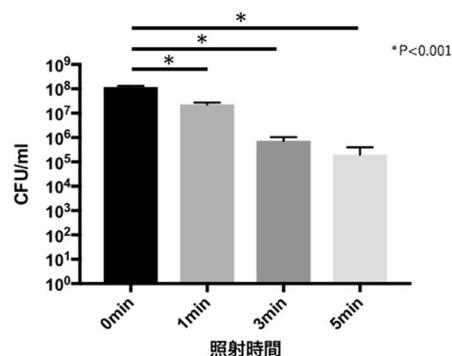


図7 照射時間の影響 (0.7W)

さらに、レーザー照射出力の殺菌効果への影響を調べた。その結果、照射条件を RPT モード (Duty cycle 50%, 100ms) 1 分間に設定した場合、0.7W の照射でも、検出細菌数の有意な減少を認めた (図 8)。また、1.4W、2.1W の照射ではさらに顕著になり、照射出力依存的に検出細菌数の減少が認められた (図 8)。

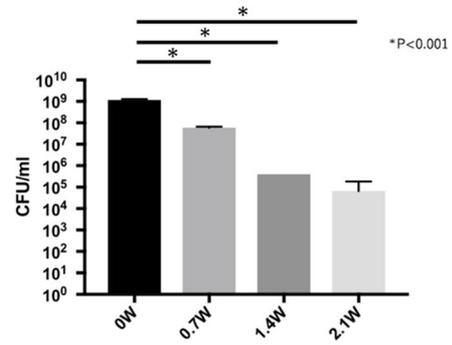


図 8 照射出力による影響 (1 分間)

(3) 温度変化を指標とした歯周組織への安全性に関するレーザーの照射条件の検討

0.7W では照射開始から 5 分経過時でも温度上昇が極めて少なかった (図 9)。また、aPDT 群は照射開始直後に急激な温度上昇が起こることが明らかになった (図 9)。

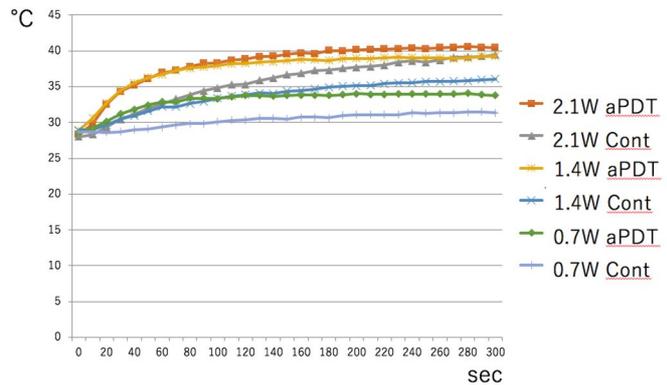


図 9 歯根表面の温度変化

(4) バイオフィームを形成した細菌に対する殺菌性に関するレーザー照射条件の検討

浮遊細菌に対する殺菌効果と歯根表面の温度変化の結果から、バイオフィームに対するレーザーの照射条件を 0.7W RPT モード (Duty cycle 50%, 100ms) 5 分間と 1.4W RPT モード (Duty cycle 50%, 100ms) 1 分間の 2 群に設定した。根管壁に形成されたバイオフィームに対し、aPDT を行った結果、両実験群で検出細菌の有意な減少を認めた (図 10)。

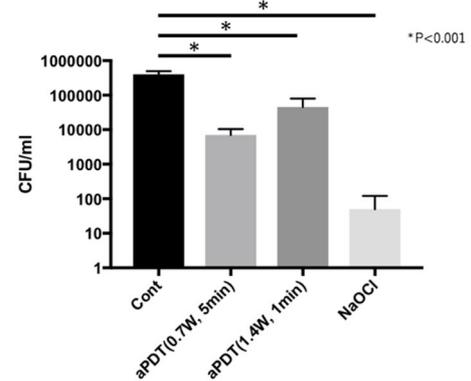


図 10 バイオフィームに対する殺菌効果

本研究の結果、さらなる研究および検討は必要であるが、ICG ナノ粒子と半導体レーザーを用いた aPDT は、難治性根尖性歯周炎に対しても生体に安全な根管消毒法として応用できる可能性が示唆された。今後、バイオフィームへの殺菌性や象牙細管への浸透性の向上について、さらなる検討ができれば、応用範囲が広がり、臨床応用の可能性が期待できると思われる。

<引用文献>

- 1) L. H. M. Cheung et al., J Endod, 2008
- 2) 須田英明ら, 第3版エンドドンティクス, 2010
- 3) M. L. Bosch-Aranda et al., J Clin Exp Dent, 2012
- 4) M. Goswami et al., Paediatr Int Child Health, 2014
- 5) M. V. Motta et al., Int Dent J, 2009
- 6) U. K. Gursoy et al., Int Dent J, 2006
- 7) J. A. Shibli et al., J Periodontol, 2003
- 8) B. W. Sigusch et al., J Periodontol, 2005
- 9) V. Chrepa et al., J Endod, 2014
- 10) A. C. Trindade et al., Photomed Laser Surg, 2015
- 11) A. Nagahara et al., J Periodontal Res, 2013

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計3件)

樋口直也、佐々木康行、稲本京子、林 潤一郎、三谷章雄、福田光男、中田和彦：インドシアニンググリーン封入ナノ粒子と半導体レーザーを用いた抗菌光線力学療法 *Enterococcus faecalis* に対する殺菌効果と歯根の温度変化。日本歯科保存学会 2018 年度春季大会(第149回)(京都), 2018.11.1

樋口直也、佐々木康行、稲本京子、林 潤一郎、三谷章雄、福田光男、中田和彦：インドシアニンググリーン封入ナノ粒子と半導体レーザーを用いた抗菌光線力学療法 (aPDT) による *Enterococcus faecalis* 殺菌効果と歯根温度変化。日本レーザー歯学会第30回記念学術大会(東京), 2018.10.21.

樋口直也、佐々木康行、林 潤一郎、三谷章雄、福田光男、中田和彦：インドシアニンググリーン封入ナノ粒子と半導体レーザーを用いた抗菌光線力学療法 aPDT による *Enterococcus faecalis* に対する殺菌効果。日本歯科保存学会 2018 年度春季大会(第148回)(横浜), 2018.6.14.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者 なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名： 三谷 章雄

ローマ字氏名：(MITANI, Akio)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。