

令和元年6月26日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20600

研究課題名(和文) 光線力学療法を応用した新規インプラント周囲炎治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new treatment for peri-implant inflammation applying photodynamic therapy

研究代表者

堀井 幸一郎 (HORII, Koichiro)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：70571686

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：抗菌的光線力学療法(a-PDT)は、光感受性薬剤と光を併用することによって抗菌効果を期待するものであり、近年、う蝕、歯周病およびインプラント周囲炎への臨床応用について研究が進められている。そこで、a-PDTにおいて口腔細菌に対する効果的な光感受性物質の種類や至適濃度、光の照射条件を検討し、さらにその治癒メカニズムを解明することを目的とした。光感受性物質としてリボフラビンを使用したa-PDTは6種類の細菌に対し殺菌効果を示さなかったが、一方でローズベンガルを使用したa-PDTは顕著な殺菌効果を示した。従って、a-PDTにおいてローズベンガルは口腔感染症に有用であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

他の光感受性物質を使用したa-PDTの抗菌性を確認する研究はあるが、リボフラビンやローズベンガルを用いたa-PDTの抗菌性に関する報告は少ない。本研究により、これまでは物理的除去や抗生剤投与でしか対応できなかった口腔内バイオフィルムの殺菌効果が期待でき、さらに、より除菌効果の高いa-PDTシステムの開発や、プラークコントロールの補助などの新しい手法としての臨床応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Antimicrobial photodynamic therapy (a-PDT), in which a photosensitizer has an antimicrobial effect under light, is expected to be clinically applied. In recent years, a-PDT has been proposed and studied as a clinical material against dental caries, periodontal disease and peri-implant inflammation. Therefore, we examined the effect of Riboflavin and Rose Bengal in several conditions, where dose of the chemicals and lighting time were changed. Furthermore, we also aimed at elucidation of the antimicrobial mechanism. Riboflavin as a photosensitizer had no antimicrobial effect on six species of oral bacteria investigated, whereas Rose Bengal had a significant antimicrobial effect on all of them. Thus, the latter is suggested to be useful for oral infectious diseases under a lighting condition.

研究分野：外科系歯学

キーワード：抗菌的光線力学療法 ローズベンガル リボフラビン

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

## 1. 研究開始当初の背景

インプラント補綴治療は治療法や製品の改良が進められ、現在では歯の欠損補綴に欠かせない治療法として多くの患者の QOL 向上に大きく寄与している。一方で、ここ数年インプラント周囲炎の患者は急増し、発生率は 30～77% に及ぶとの報告もある。さらに今後も増加すると考えられている。インプラント周囲炎はインプラント体表面及びインプラント周囲組織に形成されたバイオフィームにより、炎症反応が惹起されインプラント周囲組織が破壊される病態で、インプラントを支持している骨組織の破壊によるインプラント体の動揺や軟組織の破壊により審美障害を招き、患者 QOL の著しい低下を招く要因となっている。現在、インプラント周囲炎の治療はさまざまな方法が試みられているが、その治療は困難で確立された治療方法が求められている。

近年、光と色素の併用による化学反応を利用した抗菌的光線力学療法 (antimicrobial photodynamic therapy: a-PDT) がインプラント周囲炎治療の分野で新しい方法として注目を集めている。a-PDT は光と色素の併用による光化学反応を応用するもので、これには a 光感受性薬剤、b 光、c 酵素の三者が必要で、発生した活性酸素により細菌の細胞膜や細胞壁の損傷により殺菌効果、もしくは DNA の損傷により静菌効果を示すと考えられている。a-PDT は旧来のレーザーによる光凝固・蒸散などの物理的破壊とは異なり、低エネルギーでの光照射により病変を選択的に治療することから、正常組織に対する障害は少ない治療法として注目されている。いくつかの研究において a-PDT 療法の有用性が報告されているが、色素濃度、照射時間などに関し、効果の高い確実な条件や手技および長期的な効果が定まっていない。

a-PDT の感光剤としてはこれまでに様々な光感受性薬剤で歯周病原菌に対する殺菌効果が報告されている。このなかで、水溶性ビタミン B2 であるリボフラビンは殺菌効果に加え、2003 年に Seiler らにより角膜コラーゲンの架橋反応を促進すると報告されている。インプラント周囲炎組織は炎症によりコラーゲン線維の破壊がおこるため、リボフラビンを応用することで周囲組織の治癒促進に効果が期待できるがその効果は定まっていない。本研究は、これまでは物理的除去や抗生剤投与でしか対応できなかった口腔内バイオフィームの殺菌効果が期待でき、現在一般的に行われている治療法をさらに強化する新しい治療法として直接の成果のみならず副次的成果が得られる可能性は高い。さらに安全性、有効性に着目し、a-PDT によるインプラント周囲炎治療メカニズムまで分析し、科学的 EBM (Evidence based medicine) の観点から研究を進める点が本研究の特徴であり、常に臨床応用を強く念頭におき、より多くの人の QOL の向上につながり、『幸せな健康寿命をより長く』という社会のニーズにも応えることができると思われる。

## 2. 研究の目的

インプラント治療の進歩によりインプラント埋入後の経過年数が増えるに伴い、インプラント周囲炎が重要な問題としてクローズアップされてきているが、その治療法に関しては現在模索されている状態である。その中で注目されている治療法に抗菌的光線力学療法 (a-PDT) がある。a-PDT は光と色素の併用による光化学反応を応用するもので、発生した活性酸素により細菌の細胞膜や細胞壁を損傷することにより殺菌

効果もしくは、DNA 損傷による静菌効果を示すと考えられている。a-PDT における光の波長に関してのこれまでの報告では、赤色光(波長 620-750nm)、青色光(波長 450-495nm)さらが用いられてきた。本研究では臨床応用を考慮して、歯科診療室での応用がしやすい青色光を用いた。また、光感受性物質としてローズベンガル、水溶性ビタミン B2(リボフラビン)などで抗菌効果を示す報告がある。光感受性物質としてリボフラビンを用いた報告の中で、コラーゲンの架橋反応による結合組織性付着の改善が期待できるとされており、インプラント周囲炎で破壊された歯肉結合組織の修復に効果が期待できる。本研究では、in vitro で青色光とローズベンガル、リボフラビンを併用した新規抗菌的光線力学療法に至適条件の検索とそのメカニズムを解明し、臨床応用することを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus salivarius*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* を液体培地中で静止期まで増殖させ、吸光度を一定に調整する。菌液にリボフラビン(B2)【0.1mg/ml, 1mg/ml, 10mg/ml】の溶液を入れ、青色光照射(450-470nm, 3700-4000mW/cm<sup>2</sup>, 60秒)を行ったものを a-PDT-B2 群、菌液にローズベンガル(RB)【0.1µg/ml, 1µg/ml, 10µg/ml, 100µg/ml, 1000µg/ml, 10000µg/ml】の溶液を入れ、青色光照射を行ったものを a-PDT-RB 群とする。その他、B2 および RB 添加及び青色光照射を行わないものを Control 群、B2【0.1mg/ml, 1mg/ml, 10mg/ml】または RB【0.1µg/ml, 1µg/ml, 10µg/ml, 100µg/ml, 1000µg/ml, 10000µg/ml】を添加しただけのものを B2 または RB 群、青色光照射をしただけのものを BL 群とする。処置終了後、10 倍に段階希釈を行い寒天培地に塗抹し、37℃、嫌気環境下で培養し Colony Forming Unit を測定し評価する。(n=5)

### 4. 研究成果

B2 群、BL 群、a-PDT-B2 群は、今回使用した全ての菌種の浮遊細菌に対し殺菌効果を示さなかった。一方で、RB 群、a-PDT-RB 群は、菌種によって感受性の違いはあるが、今回使用した全ての細菌に対し殺菌効果を示した。RB 群は色素濃度に依存し、濃度が高いほど細菌の減少がみられた。さらに RB と BL を組み合わせた a-PDT-RB 群は RB 群と比較し有意な細菌数の減少を認めた。これらの結果から、RB は今回使用した菌種の浮遊細菌に対して殺菌効果を認め、さらに a-PDT は BL と RB の組み合わせを用いて、口腔感染症治療の新たな治療法として期待されると考えられた。今後は RB 単独、および BL と RB を併用時の細胞毒性の有無を明らかにするための研究が必要である。さらに、実際の口腔内においては、病原細菌は複数の細菌種でバイオフィルムを形成する形で存在しており、そのような条件下における a-PDT の効果を確認する必要があると考えられた。

*S. sobrinus*

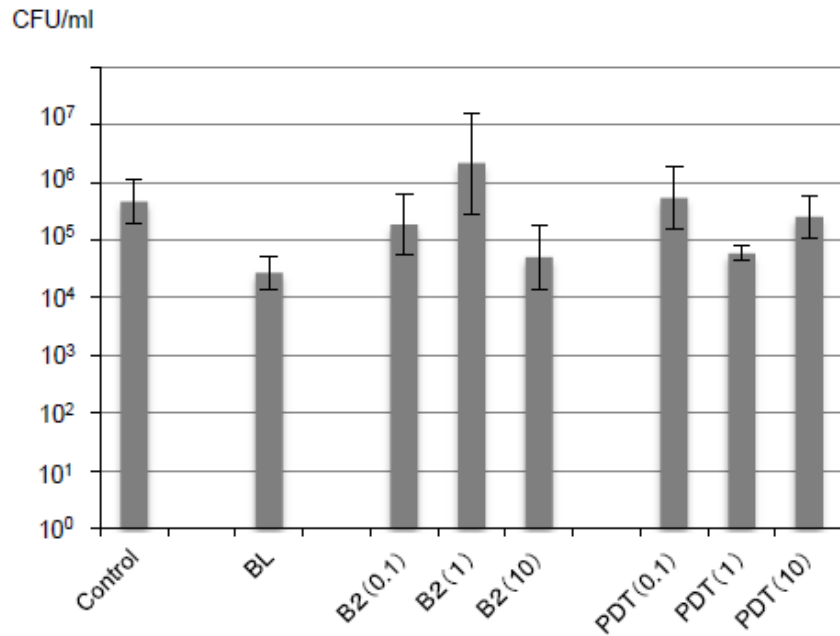


Fig. 1 *S. sobrinus*に対する青色光(BL)とリポフラビン(B2)を併用したa-PDTの効果  
カッコ内の数値はB2の濃度(mg/ml)を示す

PDT群はControl群と比較し有意な生菌数の減少を認めなかった。

*S. sobrinus*

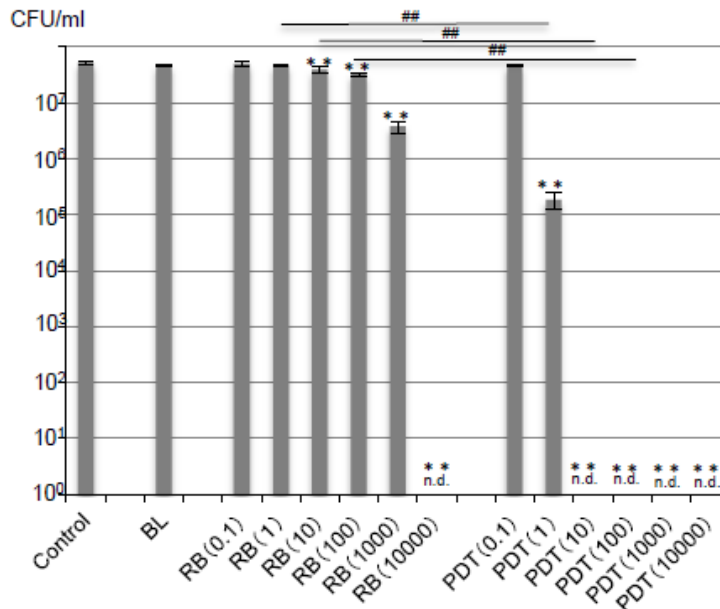


Fig. 2 *S. sobrinus*に対する青色光(BL)とローズベンガル(RB)を併用したa-PDTの効果  
カッコ内の数値はRBの濃度(μg/ml)を示す

PDT群はControl群と比較し有意に生菌数が減少した

\*\* : P<0.01 (vs Control), ## : P<0.01, n.d : CFU100以下

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 廣瀬満理奈 堀井幸一郎 長谷川義明 渋谷恭之  
浮遊細菌に対する antimicrobial Photo Dynamic Therapy ( a-PDT ) の殺菌効果  
第 72 回日本口腔科学会学術集会 2018 年
2. 津元多貴恵, 堀井幸一郎, 青木尚史, 由地 伶, 土持 師, 渋谷恭之  
インプラント周囲炎に対して光線力学療法 ( a-PDT ) を行った 1 例.  
第 70 回日本口腔科学会学術集会. 2016 年
3. 堀井幸一郎, 津元多貴恵, 由地 伶, 佐藤 隼, 高井美玲, 青木尚史, 渋谷恭之.  
青色 LED とリボフラビンを用いた抗菌的光線力学療法の効果の検討.  
第 20 回日本顎顔面インプラント学会学術大会. 2016 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6 . 研究組織

(1) 研究分担者  
研究分担者氏名：  
ローマ字氏名：  
所属研究機関名：  
部局名：  
職名：  
研究者番号 (8 桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。