

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：31602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592805

研究課題名(和文) 光増感剤を応用したレーザーによる根管内細菌検査法の有用性に関する研究

研究課題名(英文) Usefulness on detection of intracanal microbe with photodynamic agent and laser

研究代表者

木村 裕一 (KIMURA, Yuichi)

奥羽大学・歯学部・教授

研究者番号：60211877

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円、(間接経費) 750,000円

研究成果の概要(和文)：色素としてメチレンブルーを、ナノ粒子化するために生分解性ポリマーとしてポリ(ラクチド-co-グリコリド)共重合体(PLGA)を用いて粒子径250 nmの球状にナノ粒子化したものをキトサンで化学修飾して使用した。検出する器械としてDIAGNOdent(波長655 nm)を使用し、ナノ粒子化した蛍光色素の濃度(0、0.01、0.1、1、10 mg/ml)の範囲で調べた。ナノ粒子化した蛍光色素を使用すると細菌の検出感度が少し上昇した。しかし、より精度が高い診断ができるまでにはまだいくつかの課題が残された。

研究成果の概要(英文)：Methylene blue as a photosensitizer, and poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) spherical nanoparticles loaded with chitosan (particle size 250 nm) were used to combine microbe in this study. DIAGNOdent laser device (wavelength 655 nm) was used to detect photosensitizer with nanoparticles combined to microbe, and this study was performed within the nanoparticles concentration range of 0.01, 0.1, 1, 10 mg/ml. Detection sensitivity was slight increased using methylene blue-coated PLGA nanoparticles, but some problems still remain to complete diagnosis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：保存治療系歯学 歯内療法学

キーワード：光増感剤 根管治療 ナノ粒子 細菌検査 レーザー 臨床診断 蛍光色素 歯内療法

1. 研究開始当初の背景

癌の診断と治療法の一つにレーザー光化学療法というものがある。これは、腫瘍に親和性を有する光増感剤(光感受性物質)であるヘマトポルフィリン誘導體(HpD)を静脈注射し、腫瘍内に HpD を特異的に蓄積させ、その後 HpD の励起光源としてレーザーを照射すると、レーザー光と HpD の光化学反応により、腫瘍細胞を選択的に変性壊死させる方法である。この Photo-Dynamic Therapy (PDT)は 1974 年に Thomson らによって提唱され、その後の基礎的研究や照射術式の検討、内視鏡の改善などにより、腫瘍の新しい治療法として確立されつつある。この PDT の臨床で、光増感剤であるフォトフィリンが最初に承認されたのは 1993 年にカナダでの膀胱癌の治療に対してであった。その翌年には、肺癌と食道癌に対してオランダで承認されて、日本では同年に早期肺癌、食道癌、子宮頸癌に対して PDT が承認されている。時をほぼ同じくして、この PDT と同じ方法が細菌に対して応用できるかどうかに関して研究が進み、そして歯科領域においても 1990 年頃から歯周病領域における研究から始まった。細菌の中に光増感剤を取り込ませるには多少時間がかかるため、臨床応用するには問題点が残ったが、近年、ナノテクノロジーの研究が進み、光増感剤のナノ粒子を作製させ陽性に電荷を与えることができるようになり、陰性の電荷を持つ細菌の表面に電気的に付着させることで、菌体内に取り込ませるより、短時間で細菌と光増感剤を結合させることができるようになった。このように細菌に対して研究が進み、歯内療法領域への応用も始まった。

感染根管治療において根管内の無菌化の達成は根管充填前の最も重要な必須条件であり、無菌化の達成なくして良好な予後を得ることは難しいことであると考えられている。根管拡大は根管を無菌にするために極めて有効な方法であり、十分な根管拡大なしにはいかなる薬物による根管消毒も十分であるとは言えない。根管拡大を終了する時期を判定するための従来の方法は、リーマーやファイルなどの根管拡大器具に付着した根管壁の象牙質切削片における色と臭いで判定するものであるが、これは極めて主観的であいまいな方法であると言える。根管細菌検査法には細菌培養検査と細菌塗抹検査とがあり、細菌培養検査は細菌塗抹検査と比較して感度がよく、その有用性は広く認められているが、検体採取法の不備や培地の精度における限界により実際には陽性であるにもかかわらず陰性と判定されたり、根管側枝や根尖分岐および根管壁の深部に存在する細菌を証明することはできないなどの問題点が指摘されている。また、死菌や細菌の代謝産物は細菌培養検査では反応しないことに加えて、コストと手間そして判定結果を 24 時間から 48 時間待たなければなら

ないことも臨床の場での普及を制限していると考えられる。そして直感だけに頼った不確実な判断を下すことによって根管治療での予後経過が不良になることにつながっている。

2. 研究の目的

申請者はこれまでの研究から、根管拡大時における根管壁の象牙質切削片や根管貼薬に使用したペーパーポイントレーザーで測定した結果、臨床症状や根管細菌培養検査の結果との間に弱い相関関係が認められたことから、ナノ粒子化した光増感剤を用いることにより、細菌の存在と細菌培養検査の結果との相関関係がさらに明確になるのではないかと考えた。この研究の目的は、現存する根管細菌検査と比較して、光増感剤を応用することでより精度の高い、レーザーによる根管細菌検査法の有用性を判定することである。

3. 研究の方法

当大学歯学部倫理委員会に本研究の計画書を提出して承認(承認番号第 65 号)を受けた後、*in vitro* の系、すなわち細胞培養系を用いて光増感剤の細胞毒性や為害性を調べた。細胞は商業的に市販されているものの中から、口腔領域に関連性のある細胞を選択した。光増感剤として吸収波長が 600 nm 付近にあるもので代表的なものとしてローダミン B、メチレンブルー、または波長が少し異なるがインドシアニングリーンを使用してナノ粒子化した生分解性ポリマーを担体としてそれに着色したものを作製し、本研究に供した。

(1) 申請した研究期間内に行ったことは、最初に、*in vitro* の系を用いて各種の光増感剤による細胞毒性と為害性を調べ、為害性のないものを数種類まで選択した。まず、それらの光増感剤からナノ粒子化したものを作製した後、その細胞毒性と為害性を調べた。そしてそれらが細菌にのみ付着して細胞には付着しないかどうかを調べた。各種存在する光増感剤の中から、根管治療において最良と考えられるものを選択して絞り込んでいく作業を行った。この光増感剤のナノ粒子化による為害作用について培養細胞を用いた *in vitro* の系と実験動物を用いた *in vivo* の系で検討した。

(2) ナノ粒子化した蛍光色素による検出する器械の反応で最適な濃度(0、0.01、0.1、1、10 mg/ml)を調べた。それから、まずヒト抜去歯を用いて象牙細管内にどの程度侵入するのか、そして侵入の程度を増加させる方法がないのかを調べて、最適な条件を検討した。次にヒト抜去歯の根管に細菌を入れて培養し、根管拡大時における根管壁の象牙質切削片や根管に挿入してナノ粒子化した光増感剤が付着したペーパーポイントをレーザーにより測定し、その結果を申請者が今

までに研究してきた光増感剤を使用しない場合の研究結果と比較検討した。次に、ナノ粒子化した光増感剤を根管洗浄前に根管内に応用して、根管拡大により得られた象牙質切削片をレーザーで測定し得られた結果と臨床症状や簡易細菌培養検査との相関関係を調べた。また、根管内壁の象牙質切削片を取り出す前、つまり根管洗浄前にナノ粒子化した光増感剤を作用させる方が良いのか、または根管拡大し切削片を取り出した後に作用させる方が良いのかを比較検討し、臨床応用での有用性を判定した。また、根管内にナノ粒子化した光増感剤を根管洗浄前に応用した場合、根管内をレーザーで直接測定できるかどうかについても、ヒト抜去歯を用いて合わせて検討した。

(3) 次に *in vitro* の系を用いて細胞毒性と障害性の観点から数種類の蛍光色素を選択し、さらに検出する器械との関連性から応用できる可能性がある 1~2 種類までに絞りこんだ。まず、選択した蛍光色素のナノ粒子化したものを長期保存する方法を調べる必要がある。長期保存するにはどのくらいの濃度で、安定させるための添加物が必要なかどうか、またその添加物は生体に為害性がないかどうかを検討した。

(4) また、ヒト抜去歯を用いて象牙細管内にナノ粒子化した光増感剤がどの程度侵入するのかを、あまり侵入しないようなら侵入度を増加させる方法がないのかを検討し、最適な条件と方法を調べた。そして、象牙質に対して非特異的に付着する可能性がある。非特異的に付着したものを洗浄して除去する方法に関してヒト抜去歯を用いて検討した。方法としては通常の診療で使用されている 10%次亜塩素酸ナトリウムや 3%過酸化水素水、15%EDTA 液から生理食塩水にいたるまで検討した。それから、それらの洗浄剤の薬剤がナノ粒子化した光増感剤に影響を与えるかどうかを、次にナノ粒子化した光増感剤は細菌であればすべて付着するのか、特異的に付着する細菌があれば種類まで調べる必要がある。感染根管内に存在する細菌から、通常は根管内に存在しないような口腔内常在菌までいくつか選定して検討した。また、使用する際には色素の最適濃度を調べ、決定する必要がある。多方面に渡るため、同じ分野の医局員から研究協力者を募り、協力を求めた。

(5) 使用する細菌はまずは口腔内細菌から始めた。ナノ粒子化した光増感剤が細胞には毒性も為害性もなく付着もせず、細菌のみに付着するかどうかを細胞培養系と細菌培養系で調べた。また、根管内から高頻度で検出されるカンジダ菌のような真菌類や真菌に近いとされる放線菌に対しても付着するかどうかも検討した。次に付着することを増加させるため最近報告されたキトサンによる化学修飾の影響を調べた。そしてヒト抜去歯を使用して根管内から象牙細管内にナノ粒

子化した光増感剤がどの程度侵入するのか、歯をアイソメットで切断後、蛍光顕微鏡やレーザー (DIAGNOdent[®]) で調べた。通常、細菌は根管内壁表面から平均で 0.7 mm 程度侵入していることが報告されているので、ナノ粒子化した光増感剤の侵入する程度がこれより少ないようなら、根管内壁に存在するスミヤク層の除去を次亜塩素酸ナトリウムや EDTA 等のキレート剤、または超音波装置による根管内洗浄を併用して行った後、ナノ粒子化した光増感剤の侵入度を調べた。また、根管内壁のぬれや象牙細管への侵入度をよくするため、各種界面活性剤やエタノールの影響も検討した。次に、ヒト抜去歯で感染根管状態を作製して、根管拡大時において採取された象牙質切削片と根管貼薬時を想定して根管内に挿入したペーパーポイントに付着したナノ粒子化した光増感剤を使用してレーザーにより測定した。得られた結果は同時に行う簡易細菌培養検査で得られた結果と比較検討した。また、ナノ粒子化した光増感剤を根管洗浄前に応用した後、根管拡大を行い、根管内壁の象牙質切削片をレーザーで測定した。また、根管内壁をレーザーで直接測定できないか検討した。問題点があればその都度、対策を講じた。

(6) また、今回の研究では検出を主な目的としていたが、将来的には治療にも応用すべくナノ粒子化した光増感剤の殺菌効果も検討した。最も検出感度が良かったキトサン修飾した PLGA と 5%、10%、20%、30%のカテキン配合洗浄液、および 25%、50%次亜塩素酸水配合洗浄液を作製し、*E faecalis* の菌叢に作用させた。比較対照として 5%次亜塩素酸ナトリウム洗浄液を使用した。

4. 研究成果

(1) 蛍光色素としてローダミン B (蛍光ピーク波長 580 nm) とインドシアニングリーン (蛍光ピーク波長 780 nm) の 2 種類を用いた。そしてこれらの色素を、材質としてポリ D,L 乳酸(PLA)を用いて、形状は球状で粒子径は 250 nm のナノ粒子化したものを使用した。最初に *in vitro* の系を用いて、2 種類の蛍光色素が及ぼす細胞毒性と障害性について調べた。細胞株として Ca9-22 を用いて濃度 (0、10、100、1000 $\mu\text{g/ml}$) の範囲では 24 時間後の細胞死については濃度依存的に若干の増加傾向にあったが、有意差は認められなかった。次に細胞株 KB と Ca9-22 の 2 種類を用いて濃度 (0、10、100、1000 $\mu\text{g/ml}$) の範囲でトリチウムを用いてラベルしたチミジンの取り込みを 24 時間後に調べたところ、細胞株 Ca9-22 を用いたローダミン B の色素による影響は全く認められず、細胞株 Ca9-22 を用いたインドシアニングリーンの影響と細胞株 KB を用いたローダミン B とインドシアニングリーンの影響では濃度依存的に若干のチミジンの取り込み抑制傾向が認められたが、有意差とはならなかった。限

定的な時間と濃度ではあるが、in vitro の系では細胞毒性や障害性は、使用した2種類の蛍光色素ではないことが示唆された。

(2) 検出する器械として DIAGNOdent® (波長 655 nm) を使用し、2種類のナノ粒子化した蛍光色素による反応を濃度 (0、0.01、0.1、1、10 mg/ml) の範囲で調べた。濃度依存的に反応は強くなったが、2種類の蛍光色素を比較すると、検出する器械の波長との関係でローダミン B の方が器械の反応において良いように考えられた。また、細菌との関係では特定の菌種でなく口腔内の常在菌の複合した菌が存在すると反応が強くなることから細菌には付着していることが考えられた。リーマーやファイルなどの根管内に使用する器具に付着した切削片を今回使用した検出する器械で測定することは容易にできるが、根管を測定するにはプローブの大きさの問題があり、また一般的にナノ粒子化した蛍光色素は、象牙質に非特異的に付着する傾向にあるので、今後、いかに非特異的に付着するのを防ぐかが課題として残った。切削片を根管外に取り出して測定する場合、ナノ粒子化した光増感剤を使用すると、使用しない場合と比較すると少し感度が上昇したが、有意差が確認できるまでにはいたらなかった。また、レーザーで測定して得られた値と簡易培養試験結果との相関関係の確認を得ることはできなかった。

(3) ローダミン B とインドシアニングリーンと比較するとメチレンブルー (ピーク波長 610 nm と 665 nm の2波長) は検知するレーザー機器 (DIAGNOdent®) との反応が少し向上した。さらに検知度を向上させるため生分解性ポリマーをポリ乳酸 (PLA) からポリ (ラクチド-co-グリコリド) 共重合体 (PLGA) に変更した場合、同じくナノ粒子化 (粒子径 250 nm) してもものにメチレンブルーを付着して使用した場合、レーザーによる検知度は少し上昇した。濃度 (0、0.01、0.1、1、10 mg/ml) の範囲では、PLA から PLGA に変更することで 1 と 10 mg/ml の濃度では 1.2 倍ぐらい検出感度が上昇したが、それ以下の濃度では変化はなかった。検出感度は濃度依存的に増加したが、低濃度である 0.01 と 0.1 mg/ml の濃度ではかなり低い値になった。ナノ粒子化すると細菌への付着も良くなるが、色素を添加するとナノ粒子化したものは表面積が小さくなるため、それに伴い色素の付着量も少なくなりレーザーによる検出が難しくなることも判明した。また、保存状態に関しては、常温で保存すると分解されて感度が低下したことから、できるだけ高濃度でしかも低温で遮光して保存することが望ましいと判明した。

(4) 象牙細管への侵入度はスミヤ層の存在とかなり関係しており、スミヤ層がかなり存在していると妨害されてほとんど侵入しないが、スミヤ層を EDTA 等の薬剤により除去するとナノ粒子は 0.1 mm 程度は容易

に侵入していくことが確認された。ただ、十分に奥まで (約 0.7 mm) そして十分な量を侵入させることはなかなか難しいことが認められた。スミヤ層の除去には次亜塩素酸ナトリウムや超音波装置だけでは十分でなく、EDTA または次亜塩素酸ナトリウムと超音波装置の併用が効果的であった。

(5) 採取方法に関しては、蛍光色素を根管内に応用して細菌と反応した切削片をリーマー、ファイルで取り出して測定する方法が良かった。根管外に取り出した切削片は、既存の DIAGNOdent® で測定できるが、根管を直接は測定できない。DIAGNOdentPEN® にペリオ用プローブを使用する場合、根管を #60 まで拡大すると容易に根管内に挿入できて直接測定することも可能であったが、レーザー光がプローブ先端からほとんど直進するため測定できる範囲が限定的になってしまい、根管側壁をなかなかうまく測定できなかった。

蛍光色素として用いたローダミン B (蛍光ピーク波長 580 nm)、インドシアニングリーン (蛍光ピーク波長 780 nm) そしてメチレンブルー (ピーク波長 610 nm と 665 nm の2波長) の3種類を比較すると、検出する器械として DIAGNOdent® (波長 652 nm) を使用したことから、メチレンブルーが最も感度が良く検出できた。ナノ粒子化するために用いた材質としてポリ D,L 乳酸 (PLA) とポリ (ラクチド-co-グリコリド) 共重合体 (PLGA) を比較検討すると、PLGA の方が少し感度良く検出できた (1、10 mg/ml の濃度のみ)。また、PLGA 単独よりキトサンによる化学修飾する方が少し感度の点において良く検出できた。人工歯の根管内では問題なく細菌と付着したナノ粒子のみを検出できるが、抜去歯の根管内では象牙細管内にナノ粒子が入り込むため、非特異的に付着したような状態が生じて正確な診断ができにくい結果となった。

(6) また、今回の研究では検出を主な目的としていたが、将来的には治療にも応用するべく殺菌効果も検討した結果として 1、10 mg/ml の濃度でもキトサン修飾した PLGA にはほとんど殺菌作用はなく、一方、5% 次亜塩素酸ナトリウム洗浄液、25%、50% 次亜塩素酸水配合洗浄液は 5 分間の作用でコロニー形成は認められなかった。一方、カテキン配合洗浄液は 20%、30% では 10 分間の作用、10% では 20 分間作用、5% では 30 分間の作用でコロニー形成が起こらなかった。これらの結果から判断するとナノ粒子をキトサン修飾した PLGA に付着させてもそれ自体では殺菌作用はほとんどないことが判明した。レーザー等の光と組み合わせる必要があると考えられた。

以上の結果から、検出する器械として DIAGNOdentPEN® は根管を #60 まで拡大すると根管内へ挿入でき、直接根管を測定できるが、測定できる範囲が限られてくるので、

できるだけ切削片をリーマーやファイル等に付着させて測定した方が良いことが示唆された。本研究では蛍光色素を使用することで、劇的な検出感度の増加はみられなかったが、この点に関しては今後の課題として残ってしまった。

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)

Sakaki S, Kimura Y, Imai H, Sato Y, Kamada A, Kurumada F, Yamazaki N, Yamada M, Amano Y, Masuda Y, Yamada Y, Koba K: Effects of blood contamination on sealing ability and microhardness of mineral trioxide aggregate used as a root-end filling material; 日歯保存誌 査読有 56, 200-207, 2013.

Kimura Y, Tanabe M, Imai H, Amano Y, Masuda Y, Yamada Y. Histological examination of experimentally infected root canals after preparation by Er:YAG laser irradiation. Lasers Med Sci, 査読有 26: 749-754, 2011.

〔学会発表〕(計 1 件)

Kimura Y, Yamada Y, Masuda Y, and Koba K: Effects of contamination on sealing ability and microhardness of mineral trioxide aggregate as a root-end filling material. The 9th World Endodontic Congress 2013. 5. 26, 東京

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

木村 裕一 (KIMURA Yuichi)
奥羽大学・歯学部・教授

研究者番号：60211877

(2)研究分担者

今井 啓全 (IMAI Hiroaki)

研究者番号：10265209

(3)連携研究者

()

研究者番号：