

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791977

研究課題名(和文) プラーク染色剤を利用した光線力学殺菌療法による新しい歯科疾患予防法・治療法の確立

研究課題名(英文) A novel preventive technique of dental diseases based on photo-dynamic anti-microbial therapy utilizing plaque disclosing liquid

研究代表者

中村 圭祐 (Nakamura, Keisuke)

東北大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：30431589

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：プラーク染色剤に含まれる色素は光増感作用を有しており、特定波長の光によって励起される。励起された色素が基底状態に戻るときに、活性酸素の一種である一重項酸素が生成される。一重項酸素は強い酸化力を有しており、細菌に作用することで殺菌作用を示す。本研究では、プラーク染色剤を用いた光線力学殺菌療法が虫歯の原因菌である *Streptococcus mutans* に対して強い殺菌力を示すことを実証した。また、プラーク染色剤に加えて、ポリフェノールに対して光照射を行うことでも殺菌効果が得られることが分かり、新しい光線力学殺菌療法となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Dyes contained in plaque disclosing liquid can be activated by photo-irradiation with a specific wavelength. The activated dyes generate singlet oxygen, a type of reactive oxygen species, when they return to the ground state. Since singlet oxygen has strong oxidative effect, it exerts bactericidal activity when reacts with bacteria. In the present study, it was demonstrated that the photodynamic antimicrobial therapy exerted strong bactericidal action on cariogenic bacteria (*Streptococcus mutans*). In addition, it was found that photo-irradiation of polyphenol aqueous solution also exerted bactericidal effect. Thus, it is suggested that this technique can be used a novel photodynamic antimicrobial therapy.

研究分野：医歯薬学

キーワード：光線力学療法 殺菌 一重項酸素 水酸化ラジカル プラーク染色剤 ポリフェノール

1. 研究開始当初の背景

カリエスや歯周病に代表される多くの歯科疾患は口腔内細菌による感染症であるため、病原細菌の除去が歯科治療の第一の目的となる。従来の歯科治療では、スケーラーや切削器具などを用いて感染歯質および健全歯質ごとプラークを除去する機械的方法が主たる方法として用いられている。一方、薬剤などを用いた化学的なプラーク除去も補助的な方法として用いられる場合がある。しかしながら、従来の歯科治療法のみでは病原細菌の取り残しによる治癒不全や再発が認められる症例が存在するため新たな治療法の確立が求められている。

近年、新しい化学的なプラーク除去法として、光線力学殺菌法が注目されてきている。光線力学殺菌法とは、光増感作用を有する物質（光感受性物質）に対して励起波長を照射することで活性酸素の一種である一重項酸素を生成して殺菌を行う方法である。歯科分野では、主としてフェノチアジン色素（メチレンブルーやトルイジンプルー-0）が光感受性物質として利用されている。メチレンブルーとトルイジンプルー-0の励起波長は、それぞれ660 nmと630 nmの赤色可視光であるため、光自体の安全性に問題はなく臨床応用しやすいといった利点がある。Invitroの殺菌試験において、フェノチアジン色素を用いた光線力学殺菌法の殺菌効果は確認されており、すでに歯周病治療の分野で臨床応用が進められている。しかしながら、臨床研究においては、既存療法に光線力学殺菌法を併用することで得られる付加的治療効果が明確に実証されていないのが現状である。一つの理由としてはフェノチアジン色素を用いたPDTの殺菌効果が、歯周病治療を目的とした場合には十分でない可能性が考えられる。そこで、申請者らはより効果的な殺菌作用が期待できるプラーク染色剤に含まれるキサントニン色素（ローズベンガルやエリスロシン）を応用した光線力学殺菌法を提案してきた（Nakamura et al. 2011）。

2. 研究の目的

本研究では、プラーク染色剤を用いた光線力学殺菌法のバイオフィルムに対する殺菌効果の評価、および殺菌効果の改善法の検討を目的とした。さらに、新たな殺菌法として光線力学殺菌法の一つと考えられるポリフェノール光照射殺菌法の評価も行なった。

3. 研究の方法

(1)キサントニン色素とフェノチアジン色素を用いた光線力学殺菌法の比較

キサントニン色素 2 種類（ローズベンガル（RB）、エリスロシン（Ery））とフェノチアジン色素（メチレンブルー（MB）、トルイジンプルー-0（TBO））を実験に用いた。また、殺菌対象として *Streptococcus mutans* JCM 5705 を供試した。純水に溶かした色素と生

理食塩水に懸濁した *S. mutans* を混和し、色素の最終濃度が 10 $\mu\text{mol/L}$ 、菌数が 10^8 コロニーフォーミングユニット（CFU）/mL となるように調製した。調製した試料に対して励起波長のレーザー（RB: 532 nm、Ery: 532 nm、MB: 660 nm、TBO: 635 nm）を放射照度 80 mW/cm² で 1~3 分照射した。照射後に 10 倍希釈系列を作製し、寒天平板塗抹法 によって生菌数の評価を行った。

(2)実験的バイオフィルムに対する殺菌効果の検証

キサントニン色素 3 種類（RB、Ery、フロキシシン（Phi））を実験に用いた。また、殺菌対象として *S. mutans* JCM 5705 を供試した。細菌を 1%スクロース含有 BHI 液体培地に懸濁し、96 ウェル・マイクロプレートに播種した。37 °C で 24 時間嫌気培養後、非付着菌を洗浄・除去し、ウェル底面に形成されたバイオフィルムを殺菌試験の対象とした（図 1）。ウェルに各色素の水溶液（10 および 100 $\mu\text{mol/L}$ ）を入れて、波長 532 nm のレーザーを放射照度 240 mW/cm² で 3 分間照射した（図 1）。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。

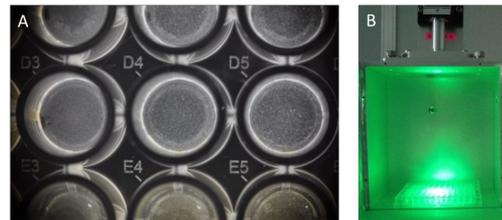


図1 殺菌試験概要。(A)マイクロプレートのウェル底面に形成させた *S. mutans* の実験的バイオフィルム。(B)ウェル上面からのレーザー照射。

(3)光線力学殺菌法と電解水の併用による実験的バイオフィルム殺菌効果の検証

0.075%食塩水を電解装置（Mini Super Water JED-007, Altec Janix）を用いて電解し、酸性電解水（pH: 2.5、有効塩素濃度: 55 ppm）とアルカリ性電解水（pH: 11.5）の両方を実験に供試した。上記の実験と同様の色素および細菌を用いた。実験的バイオフィルムを形成させたウェル中で、各色素と各電解水を混和し、色素の最終濃度が 10 および 100 $\mu\text{mol/L}$ となるように調製した後、レーザー照射を行った。処理後の生菌数の評価は上記の実験と同様の方法で行った。

(4)ポリフェノール光酸化法を応用した光線力学殺菌法の評価

ポリフェノールは波長 400 nm 付近の光に暴露されると光酸化を介して活性酸素を生成することが予備試験において確認された。そこで、植物性食品に豊富に含まれるポリフェノールを応用することでより生体安全性

の高い光線力学殺菌法を確立できるかどうかの詳細な検討を行った。

実験には、代表的な水溶性ポリフェノールとして没食子酸 (GA)、カフェイン酸 (CA)、クロロゲン酸 (ChA)、エピガロカテキン (EGC)、エピガロカテキンガレート (EGCg)、プロアントシアニジン (PA) を実験に用いた。各ポリフェノールを純水に溶解し、最終濃度が 1 mg/mL となるように調製して実験に用いた。各ポリフェノール水溶液に対して波長 400 nm の光 (LED 光) を放射照度 260 mW/cm² で照射した際に生成される一重項酸素とヒドロキシルラジカルの分析を電子スピン共鳴分析 (ESR) 法によって行った。また過酸化水素の定量分析をキシレノールオレンジ-鉄錯体法によって行った。

殺菌試験では、3 種類のグラム陽性菌 (*Enterococcus faecalis* JCM7783, *Staphylococcus aureus* JCM 2413, *S. mutans* JCM 5705) と 3 種類のグラム陰性菌 (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* JCM 2434, *Escherichia coli* JCM 5491, *Pseudomonas aeruginosa* JCM 6119) を対象とした。光照射を 0, 5, 10 分間行い残存生菌数の比較を行った。また、代表細菌として *S. aureus* を用いて脂質過酸化の評価と DNA の酸化傷害の程度を生化学的に評価した。

4. 研究成果

(1) キサンテン色素とフェノチアジン色素を用いた光線力学殺菌法の比較

キサンテン色素とフェノチアジン色素をそれぞれの励起波長の光を同じ放射照度で照射した場合の *S. mutans* に対する殺菌効果を調べたところ、キサンテン色素を用いた光線力学殺菌法の方が強い殺菌作用を発揮することが分かった (図 2)。

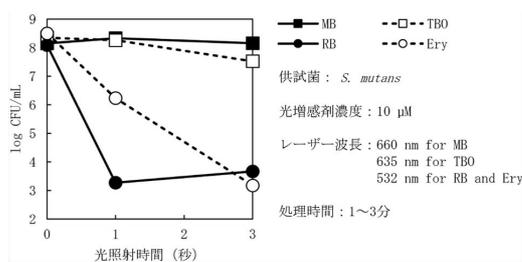


図2 キサンテン色素とフェノチアジン色素を用いた光線力学殺菌法の比較。

キサンテン系色素は歯科分野においてブラーク染色剤として使用されている色素であり、すでに口腔内で用いられているため安全性には問題がないと考えられる。

(2) 実験的バイオフィルムに対する殺菌効果の検証

RB, Ery, Phl を 10 μmol/L で用いて、*S. aureus* の懸濁液を処理した場合には3分間の処理で 4-log 以上の生菌数の減少が認められたが、バイオフィルムの場合にはほとんど殺

菌効果は認められなかった (< 1-log 未満)。そこで、各色素を 100 μmol/L で用いて同様の試験を行ったところ、1-log 程度の生菌数の減少を伴う殺菌効果が認められた (図 3)。

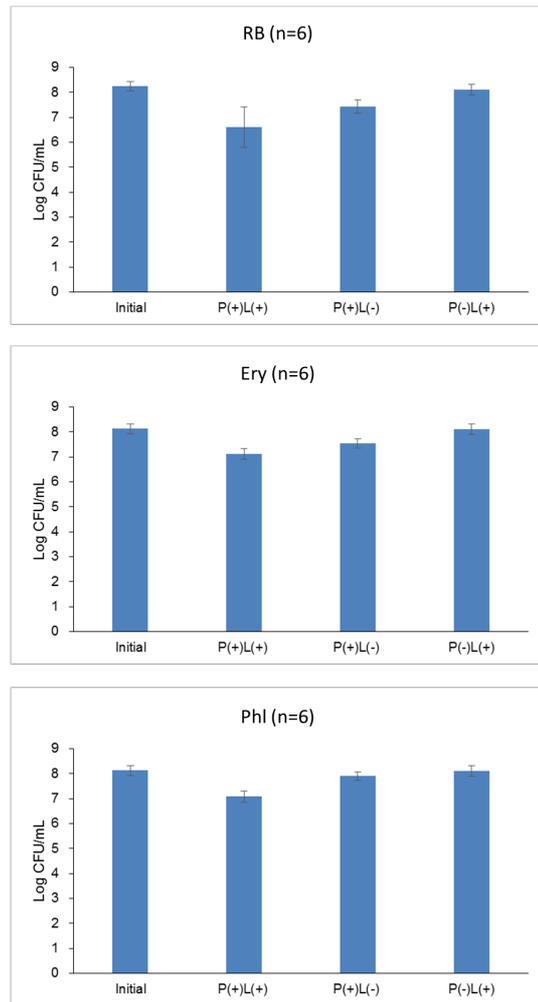


図3 *S. mutans* の実験的バイオフィルムに対する殺菌効果。P (+, -) は光感受性物質の有無を表し、L (+, -) はレーザー照射の有無を表す

殺菌対象がバイオフィルムとなると著しい殺菌効果の減少が認められた。

(3) 光線力学殺菌法と電解水の併用による実験的バイオフィルム殺菌効果の検証

上記の実験結果を受け、より効果的な殺菌作用を得るために電解水との併用を検討した。酸性電解水およびアルカリ性電解水だけを用いて実験的バイオフィルムを処理した場合には殺菌効果は認められなかった。光線力学殺菌法と酸性電解水を用いた場合には、併用効果は認められなかったが、アルカリ性電解水を用いた場合には併用効果が認められ、併用しない場合と比較して 1-log 程度生菌数の減少が認められた。特に RB においてはその効果が顕著に認められた (図 4)。

これはアルカリ性電解水にはバイオフィルムの破壊作用があるため、光線力学殺菌法との併用効果を示したものと考えられる。

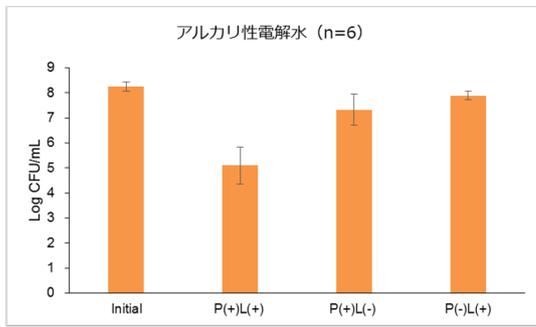


図4 *S. mutans*の実験的バイオフィルムに対するRBとアルカリ電解水を用いた光線力学殺菌法の殺菌効果。P(+, -)は光感受性物質の有無を表し、L(+, -)はレーザー照射の有無を表す

(4)ポリフェノール光酸化法を応用した光線力学殺菌法の評価

アルカリ性電解水の併用で光線力学殺菌法のバイオフィルムに対する殺菌効果が増強することが分かったが、アルカリ性電解水を生体に対して用いると健常組織に対する為害作用が懸念される。そこで、より生体安全性が高いと考えられる新たな殺菌法としてポリフェノール光酸化法を応用した光線力学殺菌法の評価を行なった。

先行研究においてポリフェノールの一種であるクルクミンを用いた光線力学殺菌法が提案されている。しかしながら、殺菌活性の主体を担う物質が一重項酸素なのか他の活性種なのかを示されていない。そこで、本研究では、まずポリフェノール照射法で生成される活性種の定性・定量分析を行った。結果を図5に示す。

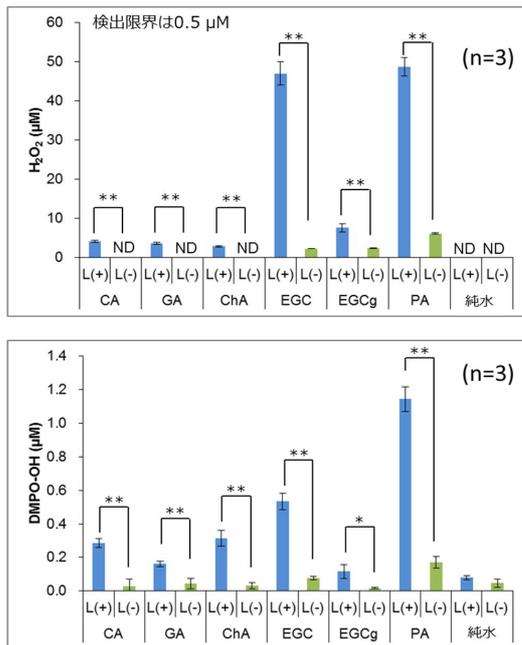


図5 各種ポリフェノールに照射を行った場合の(上)過酸化水素生成量と(下)ヒドロキシルラジカル(DMPO-OH)の生成量。L(+, -)は照射の有無を表す。p<0.05 (*), p<0.01 (**)

ポリフェノール水溶液への照射により、ヒドロキシルラジカルおよび過酸化水素の生成が認められたが、一重項酸素の生成は認められなかった。したがって、ポリフェノール光酸化法を応用した方法は、一重項酸素が殺菌活性の主体を担う従来の光線力学殺菌法とは異なる作用機序であることが示唆された。

次に、各ポリフェノール水溶液に対する照射で得られる殺菌試験の結果を表1に示す

表1 処理後の生菌数の対数減少値(n=3)

遮光10分

		CA	GA	ChA	EGC	EGC g	PA	純水
G(+)	<i>E. faecalis</i>	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	2.2	0.0
	<i>S. aureus</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	<i>S. mutans</i>	0.8	1.0	1.5	0.0	0.0	0.5	0.0
G(-)	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	1.5	0.7	0.9	0.2	3.5	0.2	0.0
	<i>E. coli</i>	0.1	0.2	0.4	0.1	1.0	0.1	0.0
	<i>P. aeruginosa</i>	2.7	2.7	2.8	0.6	1.0	1.5	0.8

照射5分

		CA	GA	ChA	EGC	EGC g	PA	純水
G(+)	<i>E. faecalis</i>	2.6	0.0	1.0	0.0	0.0	3.0	0.0
	<i>S. aureus</i>	>5	0.6	1.0	0.1	0.0	0.0	0.0
	<i>S. mutans</i>	>5	1.9	>5	0.3	0.4	1.5	0.4
G(-)	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	>5	>5	>5	1.6	3.0	>5	2.4
	<i>E. coli</i>	>5	2.2	3.2	0.2	1.1	0.9	0.3
	<i>P. aeruginosa</i>	>5	>5	>5	2.1	3.1	3.8	2.0

照射10分

		CA	GA	ChA	EGC	EGC g	PA	純水
G(+)	<i>E. faecalis</i>	4.0	0.0	>5	0.1	0.1	>5	0.0
	<i>S. aureus</i>	>5	2.9	>5	0.7	0.2	3.6	0.2
	<i>S. mutans</i>	>5	3.2	>5	0.6	0.6	4.6	1.1
G(-)	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	>5	>5	>5	2.7	>5	>5	3.9
	<i>E. coli</i>	>5	>5	>5	1.0	2.2	1.6	1.0
	<i>P. aeruginosa</i>	>5	>5	>5	3.8	>5	>5	2.8

遮光状態で各種細菌をポリフェノールで処理した場合にはほとんど殺菌効果は認められなかった。照射を行った場合には、照射時間に依存した殺菌効果が認められ、特にフェノール酸(CA, ChA, GA)では強い殺菌効果が認められた。

生化学的分析の結果、本殺菌法において、細菌の脂質過酸化およびDNAの酸化傷害が引き起こされていることが分かった。すなわち、酸化反応による殺菌効果の発現が示唆された。いずれのポリフェノール水溶液でも照射によってヒドロキシルラジカルや過酸化水素の生成が認められたことから、殺菌効果の主体を担うのはこれらの活性種であることが示唆された。特に、ヒドロキシルラジカルは過酸化水素よりも強い酸化力を有するため、ヒドロキシルラジカルが主に細菌に対する酸化傷害を引き起こしたと考えられる。しかしながら、ヒドロキシルラジカルの関与が示唆されたが、殺菌活性との相関性は認められなかった。この乖離の原因として菌体へのポリフェノールの取り込みなどの要因が考えられる。

以上の結果は、ポリフェノール照射法が光線力学殺菌法とは異なる作用機序で殺菌効果を発揮する新しい殺菌法となることを示唆するものである。今後、歯科臨床応用に向けて、バイオフィルムに対する殺菌効果の検証や従来の光線力学殺菌法との併用などの検討が必要である。

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6件)

(1) Nakamura K, Ishiyama K, Sheng H, Ikai H, Kanno T, Niwano Y. Bactericidal activity and mechanism of photo-irradiated polyphenols against Gram-positive and -negative bacteria. *J Agric Food Chem*, 2015, Epub ahead of print. (査読有) doi: 10.1021/jf5058588

(2) Sheng H, Nakamura K, Kanno T, Sasaki K, Niwano Y. Microbicidal activity of artificially generated hydroxyl radicals. *Interface Oral Health Science* 2014, 2015, 203-216. (査読無) URL: http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-4-431-55192-8_17

(3) Ikai H, Nakamura K, Kanno T, Meirelles L, Sasaki K, Niwano Y. Synergistic effect of proanthocyanidin on bactericidal action of photolysis of H₂O₂. *Biocontrol Sci* 18, 2013, 137-141. (査読有) doi: 10.4265/bio.18.137

(4) Nakamura K, Shirato M, Ikai H, Kanno T, Sasaki K, Kohno M, Niwano Y. Photo-irradiation of proanthocyanidin as a new disinfection technique via reactive oxygen species. *Plos One* 8, 2013, e60053. (査読有) doi: 10.1371/journal.pone.0060053

(5) Nakamura K, Yamada Y, Ikai H, Kanno T, Sasaki K, Niwano Y. Bactericidal action of photo-irradiated gallic acid via reactive oxygen species formation. *J Agric Food Chem* 60, 2012, 10048-10054. (査読有) doi: 10.1021/jf303177p

(6) Ishiyama K, Nakamura K, Ikai H, Kanno T, Kohno M, Sasaki K, Niwano Y. Bactericidal action of photogenerated singlet oxygen from photosensitizers used in plaque disclosing agents. *Plos One* 7, 2012, e37871. (査読有) doi: 10.1371/journal.pone.0037871

〔学会発表〕(計7件)

(1) 中村圭祐. 基礎講座: 洗浄・消毒・滅菌の基礎知識-活性酸素-. 日本防菌防黴学会第41回年次大会 平成26年9月25日(東京)

(2) 中村圭祐、石山希里香、猪飼紘代、菅野太郎、庭野吉己. 各種ポリフェノールに対する青色可視光照射で得られる殺菌効果の比較検討. 日本防菌防黴学会第40回年次大会 平成26年9月10日(大阪)

(3) Nakamura K, Ishiyama K, Ikai H, Kanno T, Niwano Y. Comparison of bactericidal activity of photo-irradiated polyphenols. *The XXVIIth International Conference on Polyphenols*. September 3, 2014 (Aichi)

(4) Ishiyama K, Nakamura K, Ikai H, Kanno T, Sasaki K, Niwano Y. Bactericidal action of photogenerated singlet oxygen from photosensitizers used in plaque disclosing agents. *Innovative Research for Biosis-Abiosis Intelligent Interface Seminar 2013*, August 29, 2013 (Miyagi)

(5) 石山希里香、中村圭祐、猪飼紘代、菅野太郎、佐々木啓一、庭野吉己. プラーク染色剤を用いた新しい光線力学殺菌療法の基礎的検討. 第22回日本歯科医学会総会 平成24年11月9日(大阪)

(6) 中村圭祐、山田康友、猪飼紘代、菅野太郎、佐々木啓一、庭野吉己. ポリフェノールへの青色可視光照射により生成される活性酸素を応用した新規殺菌技術. 日本防菌防黴学会第39回年次大会 平成24年9月11日(東京)

(7) 石山希里香、中村圭祐、猪飼紘代、菅野太郎、佐々木啓一、庭野吉己. 歯垢染色剤を用いた光線力学殺菌療法の比較検討. 日本防菌防黴学会第39回年次大会 平成24年9月11日(東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 圭祐 (NAKAMURA, Keisuke)

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号: 30431589