

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09895

研究課題名(和文) 赤外自由電子レーザーによる殺菌作用及び歯周病原因子の不活性化作用についての研究

研究課題名(英文) Use of a mid-infrared free-electron laser to treat infectious diseases: Its bactericidal effects against gram-negative bacteria

研究代表者

遠山 歳三 (Toyama, Toshizo)

神奈川歯科大学・歯学部・特任講師

研究者番号：60638906

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、FELの波長可変能を応用した *Porphyromonas gingivalis* をはじめとする歯周病原細菌、常在グラム陰性菌として *Escherichia coli* の殺菌作用を基本とし、各種歯周病原細菌の赤外吸収波長を解析し決定した各種波長を照射、赤外自由電子レーザーの殺菌効果の評価を行った。その結果、波長6.62マイクロメートルに抗菌効果があることが認められた。また、6.62マイクロメートル C-H伸縮振動モードに対応している。他の波長に対して菌増殖抑制は6.62マイクロメートル照射群が最も優位であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

赤外自由電子レーザー (FEL) は中赤外領域を発振領域とする波長可変のレーザーであり、その波長域は分子の指紋領域をほぼ全域網羅しているため、殺菌作用のみならず、LPSなど細菌特有な分子の不活性化が期待できるが、歯周病治療への応用はされていない。本研究課題では、FELが照射範囲にある組織に対して温度変化をおこすことなく、人体に為害作用が少ない光線力学療法が可能であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study is based on the bactericidal effect of FEL on periodontopathic bacteria such as *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli* as endemic Gram-negative bacteria, and the effect of infrared free electron laser on periodontopathic bacteria was evaluated by analyzing the infrared absorption wavelengths of various bacteria and irradiating them with various wavelengths determined. The results showed that the laser's bactericidal effect was significantly enhanced by irradiation at wavelengths up to 6.62micrometre. As a result, the antibacterial effect was observed at the wavelength of 6.62micrometre, which corresponds to the C-H stretching vibration mode. The 6.62micrometre irradiation group was the most superior to the other wavelengths in inhibiting bacterial growth.

研究分野：細菌学

キーワード：赤外自由電子レーザー *Porphyromonas gingivalis* *Escherichia coli* aPDT 歯周病

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病は、歯周組織の破壊と歯槽骨吸収を特徴とするバイオフィルムを形成するデンタルプラーク中のグラム陰性桿菌が原因となる慢性炎症性疾患である。歯周組織の炎症は、細菌感染および細菌より産生されるリポ多糖(LPS)に対抗する宿主の応答として炎症性サイトカイン(IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ )や活性酸素種(ROS)の産生によって惹起されると考えられているが、これらの過剰な産生は歯周組織破壊や歯槽骨吸収を引き起こし、歯周炎を増悪させていることが報告されている(Tomofujiら, Free Radic Biol Med, 2009)。歯周病治療において、歯周病原細菌および菌体成分・LPSの排除が必須であるが、デンタルプラークは複数の細菌が形成するバイオフィルムである上、思春期以降の口腔に安定して定着している常在細菌であるため、その完全な除去は非常に困難である。また、内毒素であるLPSは菌体内で産生され菌体が破壊されることにより放出され、広範囲な細胞に対して耐熱性の毒性を発揮するので、従来のような殺菌作用を有する薬剤や発熱を伴うレーザー照射によって失活させることはできない。光線力学療法(Photodynamic Therapy:PDT)は、様々な波長の光を用いることで外来色素や生体内分子を励起させ、そのエネルギーを用いて抗悪性腫瘍作用や抗菌効果を発揮する治療法である。とくに、殺菌作用を発揮するPDTは抗菌光線力学療法(anti-microbial PDT:aPDT)として注目されており、近年歯周ポケット内細菌の殺菌法として歯科治療でも目覚ましい発展を遂げてきている。しかしながら、LPSに対する失活効果についての検討や殺菌メカニズムの詳細な解析の報告はほとんど行われていないなどの問題点を含んでいる。このような背景を踏まえ、本研究では、波長可変性を有し、温度変化を伴わない赤外自由電子レーザー(FEL)を用いてLPSをはじめとする菌体由来歯周病原因子の失活可能な波長を発見することにより一般的な歯周病治療に加えて、バイオフィルム形成の抑制や除去、および菌体由来歯周病原成分の失活を施すことで歯周病感染領域における細菌由来因子の完全排除が期待できる。

## 2. 研究の目的

歯周病は成人の約80%が罹患している歯を喪失する主たる原因である。歯周病はグラム陰性桿菌が原因となる慢性炎症性疾患であり、治療としては歯周外科治療や抜歯などが主であるが、口腔内の血管障害や歯槽骨喪失に關与する細菌由来のリポ多糖(LPS)の除去・失活を目的としたアプローチは行われていない。東京理科大学に設置されている赤外自由電子レーザー(FEL)は中赤外領域を発振領域とする波長可変のレーザーであり、その波長域は分子の指紋領域をほぼ全域網羅しているため、殺菌作用のみならず、LPSなど細菌特有な分子の不活化が期待できるが、歯周病治療への応用はされていない。本研究課題では、FELが照射範囲にある組織に対して温度変化をおこすことなく、人体に為害作用のないことに着目し、赤外自由電子レーザー(FEL)による殺菌作用および歯周病原因子の不活性化作用の検討を目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究は、FELの波長可変性を応用した*Porphyromonas gingivalis*をはじめとする歯周病原細菌、常在グラム陰性菌として*Escherichia coli*の殺菌作用を基本とし、以下の研究を遂行した。

研究に用いたグラム陰性菌の培養にはbrain heart infusion (BHI, Beckton, Dickinson and Company, Sparks, MD)に0.5% yeast extract (Beckton, Dickinson and Company)を加えた物を用い、必要に応じてBacto agar (Beckton, Dickinson and Company)を1.5%濃度で添加し、平板培地とした。それ以外の菌種の培養には、上記BHI、Yeast extractに加えてVitamin K1 (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和光純薬、東京)ならびにHemin (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、和光純薬)を加えた液体培地を用いた。

### (1) 各種歯周病原細菌の赤外吸収波長の解析

各種歯周病原細菌の赤外吸収波長の解析は、赤外吸収波長分光計(FT-IR)を用いて解析を行った。各種歯周病原細菌を嫌気下で培養し、発育条件を一定にした後、FT-IRにて使用細菌の吸収波長を解析し、照射波長及び照射時間を決定した。

### (2) 赤外自由電子レーザーの殺菌効果の評価

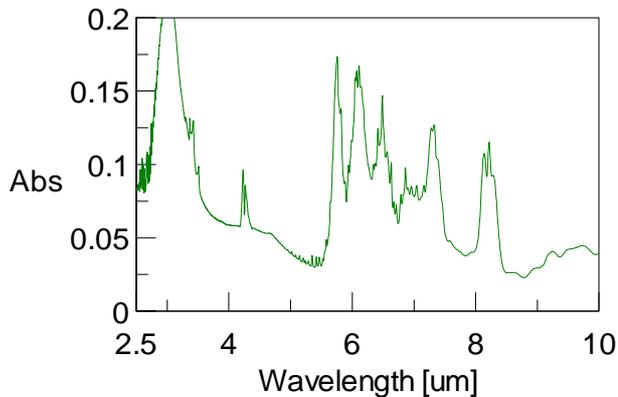
決定された条件で各波長のFELの照射を行い、照射後の細菌を各種培地に塗抹、培養し生菌数を算出するColony Forming Unit測定によりFELの殺菌効果の評価を行った。また、レーザー光照射の影響を検討する目的で、照射中はサーモカメラによる温度変化の評価を行い、照射後の各種細菌を走査型電子顕微鏡で観察し菌体の構造変化を観察した。

## 4. 研究成果

### (1) 各種歯周病原細菌の赤外吸収波長の解析

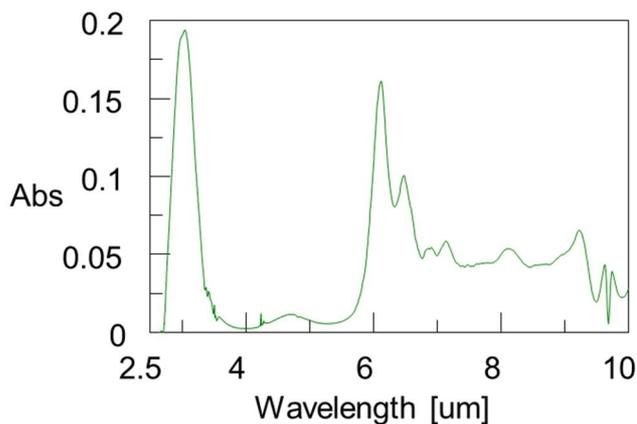
平板培地より釣菌した *E-coli* および *P.gingivaris* を乾燥状態にし、赤外吸収波長分光計（ JASCO FT/IR-6100 Fourier-transform spectrometer ）にて測定し適切な吸収波長を選択した。

#### 赤外吸収波長分光計による *E-coli* の赤外吸収波長測定



平板培地より釣菌した *E-coli* を乾燥状態にし、赤外吸収波長分光計で測定し適切な吸収波長を計測した結果 6.62 $\mu\text{m}$ 、6.88  $\mu\text{m}$ 、7.14 $\mu\text{m}$ 、8.09 $\mu\text{m}$ 、9.26  $\mu\text{m}$  の波長に対し高い吸光度を示した。

#### 赤外吸収波長分光計による *P.gingivaris* の赤外吸収波長測定



平板培地より釣菌した *P.gingivaris* を乾燥状態にし、赤外吸収波長分光計で測定し適切な吸収波長を計測した結果 6.62 $\mu\text{m}$ 、7.14 $\mu\text{m}$  の波長に対し高い吸光度を示した。

Wavelength	Corresponding functional
6.62 $\mu\text{m}$ (1510 $\text{cm}^{-1}$ )	C - H stretching
6.88 $\mu\text{m}$ (1453 $\text{cm}^{-1}$ )	C = CH <sub>2</sub> stretching
7.14 $\mu\text{m}$ (1426 $\text{cm}^{-1}$ )	C - N stretching
8.09 $\mu\text{m}$ (1236 $\text{cm}^{-1}$ )	O - C - O stretching
9.26 $\mu\text{m}$ (1080 $\text{cm}^{-1}$ )	P - O (PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ) stretching

研究【1】の結果より照射する FRL の波長は 6.62 $\mu\text{m}$ 、6.88  $\mu\text{m}$ 、7.14 $\mu\text{m}$ 、8.09 $\mu\text{m}$ 、9.26  $\mu\text{m}$  とし、照射時間は 15 分、30 分、60 分と決定した。

## ( 2 ) 赤外自由電子レーザーの殺菌効果の評価

### 赤外自由電子レーザーの *E-coli* 菌体に対する影響

波長 600 nm の吸光度を 1 に調整した各種細菌を 100  $\mu\text{L}$  とり遠心、集菌したのち上清を捨て生理食塩水 10  $\mu\text{L}$  を加え、各種レーザー照射を行った。

コントロール群はレーザー照射せず、レーザー照射時間と同時間放置したものをを用いた。照射後、サンプルを階段希釈し、その 0.1 mL を血液平板培地に塗抹し、好氣的に 5 日間培養した。生育したコロニー数より 1 mL あたりの生菌数を求め、コントロール群の生菌数に対するレーザー照射処理群の生菌数の割合を生存率とした。

コントロール群の生菌数に対する赤外自由電子レーザー照射処理群の生菌数の割合を生存率(%)として表した。実験はそれぞれ3度ずつ行い全て同じ傾向が認められ、6.62 μmの波長においては有意に殺菌効果が見られた

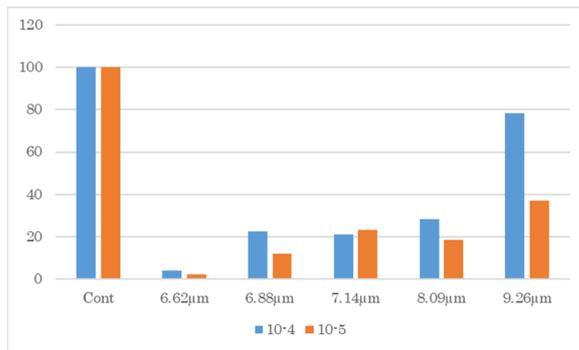
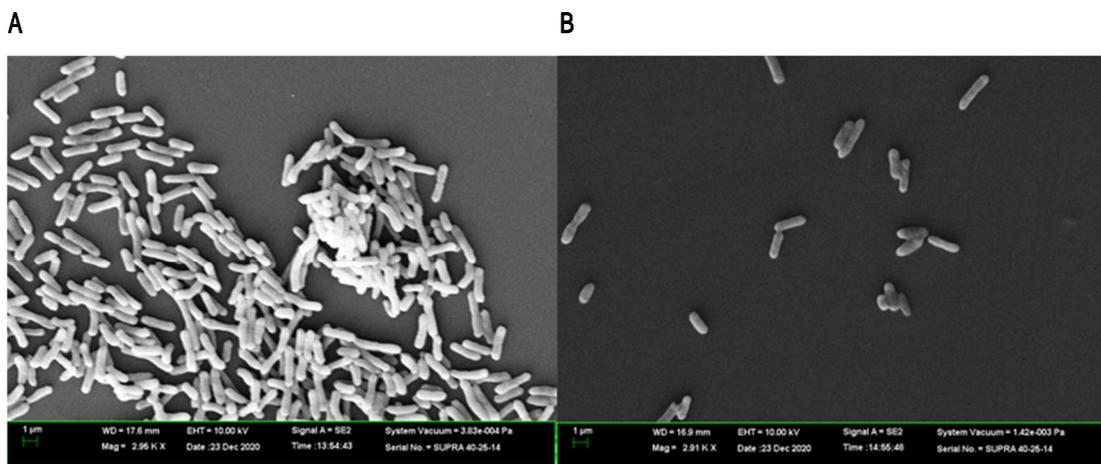
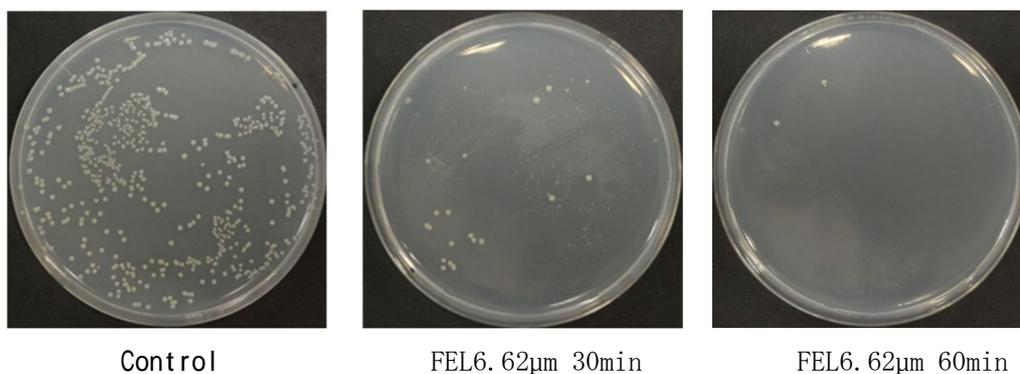


図 1.FEL 各種波長照射後の殺菌効果  
照射後の各菌体を電子顕微鏡下で観察した結果、レーザー非照射群に比較して菌体数の減少及び菌体破壊像が認められた。



A コントロール B FEL6.62 μm 15分照射後

*E-Coli* に対する赤外自由電子レーザーの殺菌効果 (60min 照射)



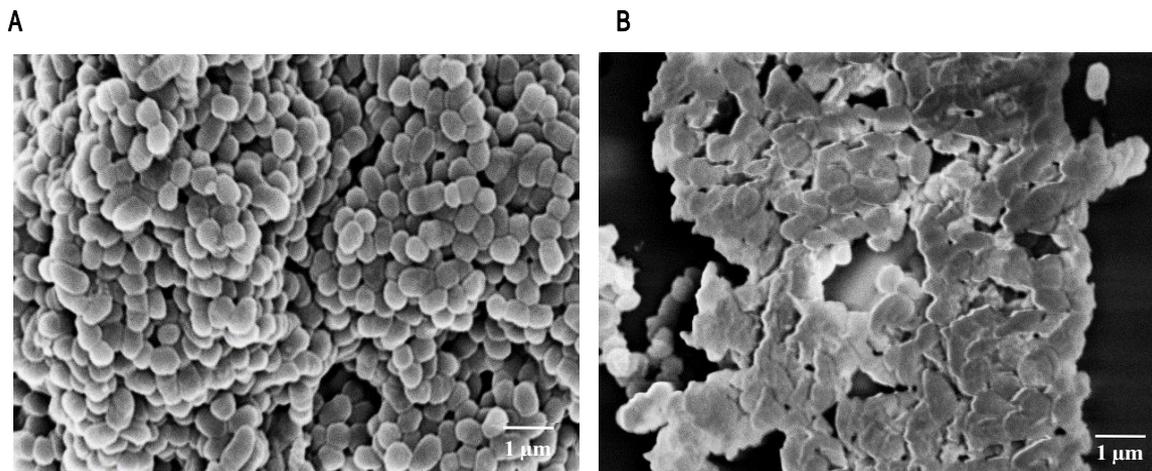
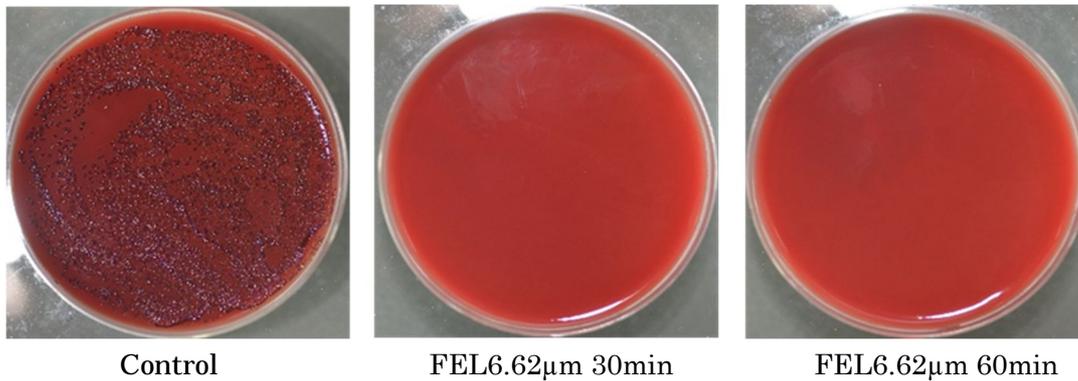
Control

FEL6.62μm 30min

FEL6.62μm 60min

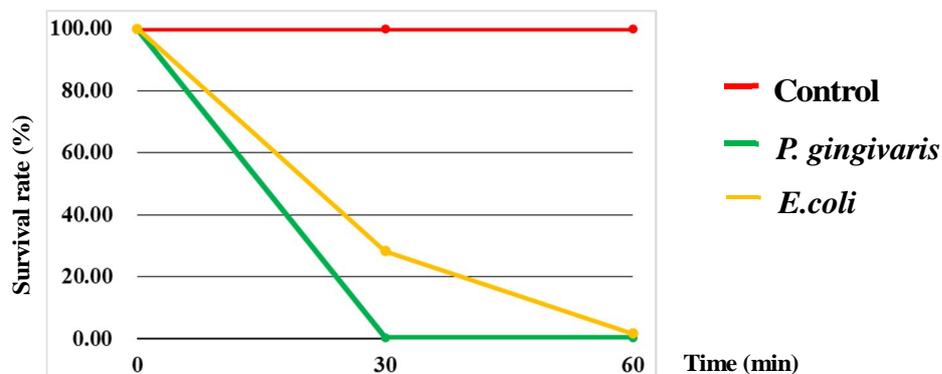
赤外自由電子レーザーの *P.gingivaris* 菌体に対する影響

照射後のサンプルを 10<sup>-5</sup>まで希釈し、平板培地に塗抹し嫌気条件下(15%CO<sub>2</sub>、15%H<sub>2</sub>、70%N<sub>2</sub>)で培養した。その後、生育したコロニー数を計測し、サンプルに含まれる生菌数を算出した。結果はコントロールにおける生存率を100%として、相対的な生存率を求め、抗菌効果を判定したコントロール群の生菌数に対する赤外自由電子レーザー照射処理群の生菌数の割合を生存率(%)として表した。



A コントロール B FEL6.62 μm 15分照射後

照射後の各菌体を電子顕微鏡下で観察した結果、レーザー非照射群に比較して菌体破壊像が認められた。



実験はそれぞれ3度ずつ行い全て同じ傾向が認められた。その結果、波長 6.62μm に抗菌効果があることが認められた

今回供試した 6.62 mm と 7.14mm はそれぞれ C-H 伸縮振動モード、アミド結合の C-N 伸縮振動モードに対応している。FEL 照射後、菌増殖抑制は 6.62 mm 照射群が最も優位であった。グラム陰性菌は細胞膜の外側にペプチドグリカンが 7-8nm の厚さで存在し、更にその外側に O 抗原などから構成される糖鎖 (LPS) を有している電子顕微鏡像からは細胞壁が破壊されて溶菌していることを示唆する結果が得られている。このことから、元々透過性に優れる中赤外領域の FEL 光は細胞壁の深部まで到達していると考えられる。メカニズムとしては分子内にアミド結合よりも C-H 結合数が多く、レーザーからのエネルギー分配効率が良いと考えられる。C-H 結合が FEL から光子エネルギーを授受し、振動準位が上昇した結果、多数箇所 C-H 基の解離が引き起こされて溶菌に繋がったと考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ozaki Yu, Morozumi Toshiya, Watanabe Kiyoko, Toyama Toshizo, Sasaki Haruka, Sato Takenori, Yamamoto Yuko, To Masahiro, Inaba Keitaro, Tsukinoki Keiichi, Hamada Nobushiro, Minabe Masato	4. 巻 62
2. 論文標題 Inhibitory effect of omega-3 fatty acids on alveolar bone resorption and osteoclast differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral Science	6. 最初と最後の頁 298 ~ 302
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2334/josnusd.19-0267	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 KOYATA Yasunori, WATANABE Kiyoko, TOYAMA Toshizo, SASAKI Haruka, HAMADA Nobushiro	4. 巻 81
2. 論文標題 Purification and characterization of a fimbrial protein from <i>Porphyromonas salivosa</i> ATCC 49407	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 916 ~ 923
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.19-0067	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shiotsu-Ogura Yukako, Yoshida Ayaka, Kan Powen, Sasaki Haruka, Toyama Toshizo, Izukuri Kazuhito, Hamada Nobushiro, Yoshino Fumihiko	4. 巻 26
2. 論文標題 Antimicrobial photodynamic therapy using a plaque disclosing solution on <i>Streptococcus mutans</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Photodiagnosis and Photodynamic Therapy	6. 最初と最後の頁 252 ~ 257
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pdpdt.2019.04.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inaba K, Koyata Y, Sasaki H, Toyama T, Hiramine H, Ogawa T, Watanabe K, Hamada N	4. 巻 54(2)
2. 論文標題 <i>Porphyromonas salivosa</i> ATCC 49407 fimbriac induced osteoclast differentiation and cytokine production.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 神奈川歯学	6. 最初と最後の頁 92 ~ 101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 WATANABE Kiyoko、HIRAMINE Hiroko、TOYAMA Toshizo、HAMADA Nobushiro	4. 巻 64
2. 論文標題 Effects of French Pine Bark Extract Chewing Gum on Oral Malodor and Salivary Bacteria	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Nutritional Science and Vitaminology	6. 最初と最後の頁 185 ~ 191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3177/jnsv.64.185	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Mitsuo、Toyama Toshizo、Watanabe Kiyoko、Sasaki Haruka、Sugiyama Shuta、Yoshino Fumihiko、Yoshida Ayaka、Takahashi Shun-suke、Wada-Takahashi Satoko、Matsuo Masato、Todoki Kazuo、Hamada Nobushiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Ameliorating Effects of Jixueteng in a Mouse Model of Porphyromonas gingivalis-Induced Periodontitis: Analysis Based on Gingival Microcirculatory System	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Natural Product Communications	6. 最初と最後の頁 1699 ~ 1703
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1934578X1801301230	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe Shuji、Toyama Toshizo、Sato Takenori、Suzuki Mitsuo、Morozumi Akira、Sakagami Hiroshi、Hamada Nobushiro	4. 巻 6
2. 論文標題 Kampo Therapies and the Use of Herbal Medicines in the Dentistry in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medicines	6. 最初と最後の頁 34 ~ 34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/medicines6010034	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Toshizo Toyama, Mitsuo Suzuki, Masato Matsuo, Kiyoko Watanabe, Fumihiko Yoshino, Ayaka Yoshida, Satoko Wada-Takahashi, Shun-suke Takahashi, Nobushiro Hamada
2. 発表標題 The changes of gingival vascular network using Jixueteng in a mouse periodontitis model
3. 学会等名 第46回日本微小循環学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋聡子, 吉野文彦, 吉田彩佳, 前畑洋次郎, 遠山歳三, 佐藤武則, 浜田信城, 李昌一, 高橋俊介
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalis感染による脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット(SHRSP)における歯肉循環変化の解析
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田彩佳, 佐々木悠, 居作和人, 遠山歳三, 浜田信城, 吉野文彦
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalis含有色素を応用した新規抗菌光線力学療法の検討
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田 彩佳, 遠山 歳三, 吉野 文彦
2. 発表標題 ラット口腔組織に対する青色 LED 光照射の酸化ストレス惹起とその防御
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 遠山 歳三, 渡辺 清子, 吉野 文彦, 吉田 彩佳, 佐々木 悠, 浜田 信城
2. 発表標題 赤外自由電子レーザーの齶蝕原性細菌に対する殺菌効果の検討
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田彩佳, 小椋有香子, 高橋俊介, 高橋聡子, 日高弘一, 杉山秀太, 前畑洋次郎, 宮本千央, 堀 紀雄, 遠山歳三, 秦 光潤, 前谷崇志, 李昌一, 岡田永三, 岡田康江, 吉野文彦
2. 発表標題 歯周病原細菌内色素を利用した新規抗菌光線力学療法の検討
3. 学会等名 第 18 回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 日高弘一, 船木誠子, 徳富文彬, 高橋聡子, 吉野文彦, 吉田彩佳, 前畑洋次郎, 宮本千央, 遠山歳三, 佐藤武則, 杉山秀太, 浜田信城, 李昌一, 高橋俊介
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalis 感染による脳卒中易発症性高血圧ラット (SHRSP) の口腔内微小循環と大動脈血管機能の修飾
3. 学会等名 第 18 回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小椋有香子, 吉田彩佳, 高橋俊介, 高橋聡子, 日高弘一, 杉山秀太, 前畑洋次郎, 宮本千央, 堀 紀雄, 遠山歳三, 秦 光潤, 前谷崇志, 李昌一, 岡田永三, 岡田康江, 吉野文彦
2. 発表標題 歯垢染色液への青色光照射を応用したう蝕病原細菌に対する影響
3. 学会等名 第 18 回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 18. 稲葉啓太郎, 佐々木悠, 遠山歳三, 佐藤武則, 渡辺清子, 合田征司, 浜田信城
2. 発表標題 Porphyromonas salivosa線毛は破骨細胞分化とサイトカイン産生を誘導する
3. 学会等名 神奈川歯科大学学会第157回例会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	吉田 彩佳 (Yoshida Ayaka)  (00609414)	神奈川歯科大学・歯学部・准教授  (32703)	
研究分担者	築山 光一 (Tsukiyama Koichi)  (20188519)	東京理科大学・理学部第一部化学科・教授  (32660)	
研究分担者	浜田 信城 (Hamada Nobushiro)  (20247315)	神奈川歯科大学・歯学部・教授  (32703)	
研究分担者	吉野 文彦 (Yoshino Fumihiko)  (20308307)	神奈川歯科大学・歯学部・准教授  (32703)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------