

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20416

研究課題名(和文) 歯科医療における光線力学療法への応用・展開

研究課題名(英文) Application and development of photodynamic therapy in dentistry

研究代表者

小峯 千明 (KOMINE, Chiaki)

日本大学・松戸歯学部・助教

研究者番号：60708577

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、光線力学療法を応用し殺菌を行う、anti-microbial Photodynamic therapy (a-PDT)を歯科医療に展開する事を目的として行った。現在までにa-PDTと各種細菌の殺菌効果に関する有効性は多数報告されているが、実験プロトコルや照射条件などに言及されているものが多く、原理となる一重項酸素の殺菌メカニズムについては十分な知見がなかった。そこで難治性根尖性歯周炎の関連菌に対してa-PDTの殺菌原理である一重項酸素と殺菌メカニズムについて電子顕微鏡を用いて視覚的に示した。またPDTを応用した歯髄保存に関する知見も本期間に得ることができた。

研究成果の概要(英文)：The present study aimed to develop antimicrobial photodynamic therapy (a-PDT) for dental treatment. It is well known that PDT, including a-PDT, can be used as a disinfection method. Numerous studies have demonstrated that many variables must be taken into account when developing an a-PDT protocol, including light parameters, photosensitizers and light delivery techniques. However, the mechanism of bacterial disinfection of singlet oxygen, which is the principle of PDT, has not yet been clarified. Therefore, in this study, we evaluated the relationship between bactericidal effects and sterilization mechanism by singlet oxygen using scanning electron microscopy. In addition, further understanding of dental pulp calcification applying PDT was obtained.

研究分野：歯学

キーワード：光線力学療法 一重項酸素 難治性根尖性歯周炎 殺菌メカニズム 低出力レーザー治療 歯髄保存療法 半導体レーザー

1. 研究開始当初の背景

実験 1: 抗菌的光線力学療法の殺菌メカニズム

う蝕，歯周病，歯髄疾患などの歯科疾患はほとんどが口腔内細菌により引き起こされる感染症である。また口腔内細菌は，心内膜炎，誤嚥性肺炎および糖尿病など全身疾患への関与が明らかになっているため，いかに細菌を制御していくかが歯科臨床における大きな課題である。歯内療法学では感染根管における治療の成功率は 60～80% である。原因の多くは細菌感染症であり，根管内の無菌化が治療の予後を大きく左右する要因となっている。その中でも，難治性根尖性歯周炎と呼ばれる根管および病変内部には *Enterococcus faecalis* (*E.faecalis*) や *Candida albicans* (*C.albicans*) が頻繁に検出されることが多く報告されている。細菌を除去する方法としては，根管の機械的・化学的清掃が行われている。歯科臨床では，リーマー・ファイル類を機械的清掃に使用し，根管内の無菌化を達成させるために，次亜塩素酸ナトリウムや過酸化水素などが根管洗浄剤として用いられている。しかしながら，根管は根管側枝や根尖分岐のほか，フィンやイスマスなどの複雑な解剖学的形態を有するため，完全に無菌化にすることは現実的に困難である。*E. faecalis* は，根管貼薬剤として用いられる水酸化カルシウム製剤やヨード系製剤，および抗菌剤に耐性を示すことから治療を困難にしている。また，次亜塩素酸ナトリウムなどの根管洗浄剤は，生体組織に対して数多くの為害性や偶発症が報告されているため，組織為害性がなく安全な殺菌法の確立が望まれていた。

実験 2: 低出力レーザーによる歯髄保存療法

歯髄保存療法の確立は，歯髄象牙質複合

体を維持する観点から重要であると考えている。そのため，歯髄組織を保存するために，日常臨床において，水酸化カルシウム製剤や MTA などのカルシウムを主体とした直接覆髄法，またはコンポジットレジン修復が臨床応用されている。しかしながら，う蝕や外傷などにより露髄を呈した場合，そのカルシウムを主体とした高いアルカリ性のため歯髄組織に炎症をきたし壊死層を形成することや不均一な修復象牙質を形成するために高い臨床効果を得られない事，また，コンポジットレジン修復においても出血等により接着困難となり，結果抜髄処置に移行することも少なくない。そのため，歯髄組織を保存するために，様々な治療法が歯内療法領域においても考えられている。

2. 研究目的

実験 1: 従来から歯科臨床では根管洗浄剤として次亜塩素酸ナトリウムは，気腫発生の危険性および根管洗浄剤自体の生体為害性が危惧されている。そこで申請者は，上記の危険性が少ない新規根管洗浄法として，今まで研究が多くされている anti-microbial PDT (a-PDT) に着目し，臨床応用を目指し研究を行ってきた。現在，難治性根尖性歯周炎関連菌である *E. faecalis* および *C. albicans* などに対する a-PDT による殺菌効果を光増感剤 (methylene blue; MB) から発生する一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) の観点から検討し，最大殺菌効果と $^1\text{O}_2$ 最少発生量の相関関係，および光増感剤には至適濃度が存在する事を解明した。そこで本申請では， $^1\text{O}_2$ による殺菌メカニズム，および歯科臨床に $^1\text{O}_2$ を応用展開する有効性かつ安全性について詳細に検討する事である。

実験 2: 歯内療法分野においても 660 nm と

810nm の半導体レーザーを至適条件下で培養ヒト歯髓由来細胞 (以下, 歯髓細胞)に照射する事で, 硬組織形成能が促進される報告がなされている。そして近年, レーザー装置の開発が進められ, 一つのレーザー装置から異なる2つの波長 660 nm と 810 nm を単独照射かつ2波長同時照射が可能な半導体レーザー装置が, 低出力レーザー治療 (Low level laser treatment ; LLLT) を目的として開発された。LLLT を歯髓保存療法に応用する際, 波長による作用メカニズムや dentinogenesis について未だ不明な点も多く, 科学的根拠に乏しいのが現状である。また, 近赤外領域で発振するレーザー光源が限られている事もあり, 作用スペクトルも十分には検討されていない。そのため, 歯髓保存療法に LLLT を応用させるにはさらなる科学的根拠が求められるため, 波長による作用の相違を解明する事は意義のある事と考える。そこで本研究では, 単波長照射と2波長同時照射を歯髓細胞に応用することで誘導される硬組織形成能に及ぼす影響について比較検討した。

3. 研究の方法

実験 1:抗菌的光線力学療法の殺菌メカニズム

a) 濃度依存的に $^1\text{O}_2$ を作用させ, 量的に $^1\text{O}_2$ を ESR spin-trapping 法にて測定し, 殺菌効果との相関関係, さらにその形態学的変化を走査型電子顕微鏡 (SEM)にて観察する。

b) 光増感剤として Methylene blue (MB, 0.01%, Wako) を用いた。MB を特異的に励起させる波長として 660 nm 半導体レーザー (200 mW, OSADA 社製) を用いた。MB に光照射を行う事で発生した $^1\text{O}_2$ は, 2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidone-N-oxyl (4-oxo-TMP, 和光純薬)を用いる事で捕捉し,

ESR (JES JFA-200, JEOL) にて測定を行った。

c) *E.faecalis* (JCM5803T)および *C.albicans* (ACTT1002)の殺菌試験は, 10^8cell/ml となるように調整し, MB を加えた後, レーザーを 0-30 分間経時的に照射し, 24 時間後の CFU を測定した。また照射後の菌体表面を SEM (JEOL)にて観察を行った。

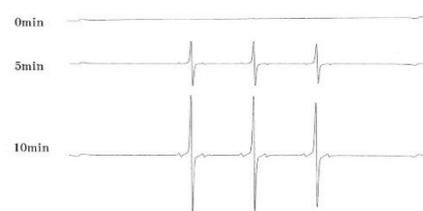
実験 2:低出力レーザーによる歯髓保存療法

レーザー照射後の歯髓細胞における硬組織形成能を評価するために, 歯髓細胞を培養した後, 単波長照射した群として 660 nm 群 (20 mW, CW) および 810 nm 群 (1.0 W, CW) そして2波長同時照射した群として 660 nm+810 nm 群(以下, 2波長群と略す)を 600 秒間照射する群を実験群とし, 無照射の細胞をコントロール群として行った。細胞増殖試験, bone morphogenetic protein (BMP) 産生量, alkaline phosphatase (ALP) 活性や von Kossa 染色にて石灰化物を計測し, 評価を行った。

4. 研究成果

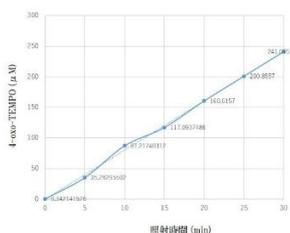
実験 1:抗菌的光線力学療法の殺菌メカニズム

a) ESR spin-trapping 法を用いた $^1\text{O}_2$ 定量
MB から生じる $^1\text{O}_2$ はレーザー照射時間依存的に増加傾向を示した。



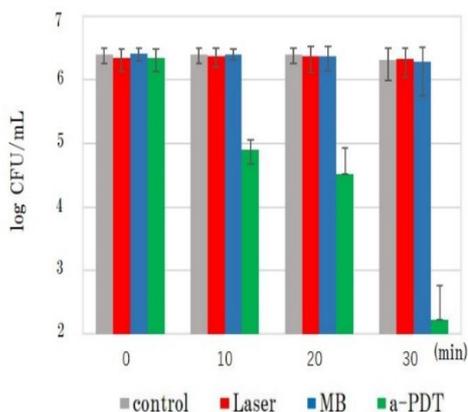
【図 1 検出された ESR シグナル(0-10min)】
検出された ESR シグナルは 4-oxo-TEMPO の信号強度を示す 1 : 1 : 1 のトリプレットシグナルが検出され, g 値は 2.0055、超微細結合

定数は 1.608 mT であった。時間依存的に 4-oxo-TEMPO と一重項酸素との反応生成物である 4-oxo-TEMPO free radical に帰属する ESR シグナルが時間依存的に増加した。したがって照射時間と $^1\text{O}_2$ 発生量には強い正の相関関係を示した ($R^2=0.9899$)。

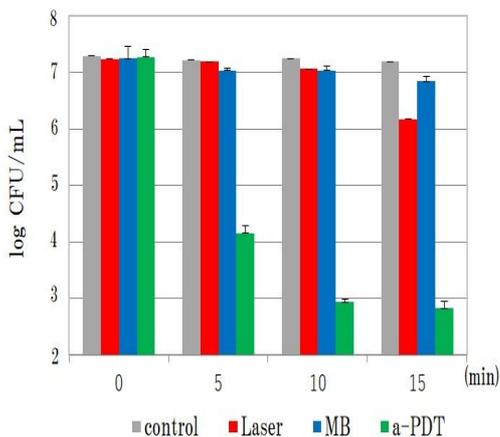


【図 2 検出された ESR シグナル】

b) *C.albicans* および *E.faecalis* の殺菌試験

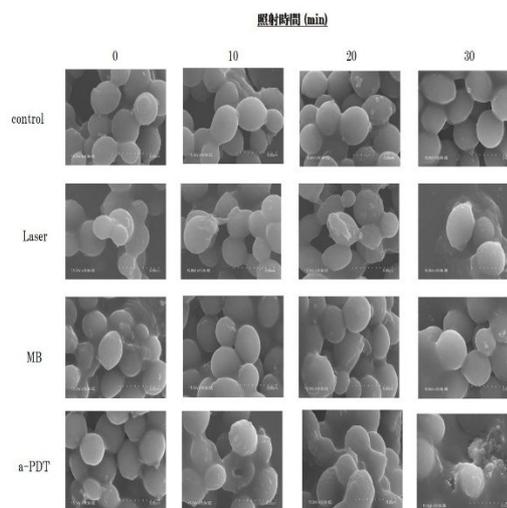


【図 3 a *C.albicans* の殺菌効果】



【図 3 b *E.faecalis* の殺菌効果】
C.albicans の殺菌率はレーザー照射時間依存的に増加傾向を示した。すなわち、 $^1\text{O}_2$ 発生量がおよそ 87.2 μM にて 96.41% (10 min) , 160.6 μM にて 98.51% (20 min) , 241.1 μM にて 99.99% (30 min)であった(図 3a)。*E.faecalis* の殺菌効果は $^1\text{O}_2$ 発生量依存的に増加し、99.9%以上の殺菌には少なくとも 35.2 μM 以上、99.99%以上の殺菌には 87.2 μM 以上の $^1\text{O}_2$ 発生量が必要であった(図 3b)。

c) $^1\text{O}_2$ に暴露された *C.albicans* の表面観察

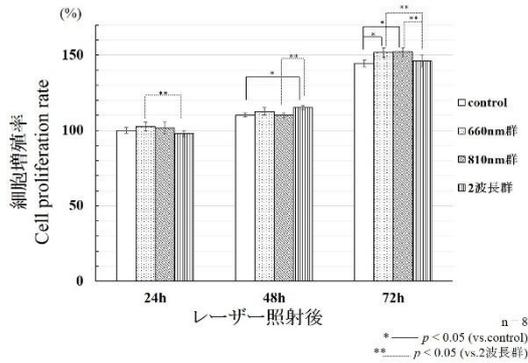


【図 4 *C.albicans* の形態学評価】

control, Laser および MB 群では、*C.albicans* 菌体表面に顕著な変化は認められなかった。一方、a-PDT 群では照射時間 10 分後から菌体表面に形態学的変化を示していた。すなわち、凹凸不整など異型性を多く認め、30 分後には細胞の破壊像を多く認め、菌体表面には表層断片物と考えられるものが観察された。以上の事より、a-PDT で発生した $^1\text{O}_2$ の殺菌メカニズムは $^1\text{O}_2$ の有する酸化力によって物理的に直接菌体表面を破壊していくものであると示唆できた。

実験 2: 低出力レーザーによる歯髄保存療法

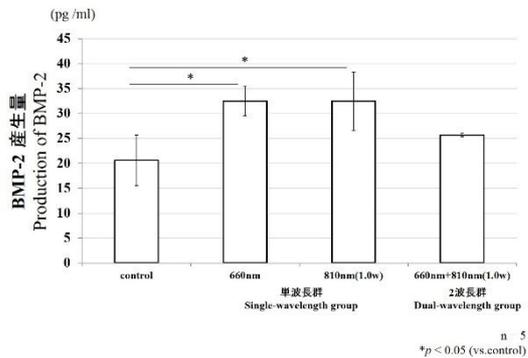
a) 細胞増殖試験



【図 5 細胞増殖試験】

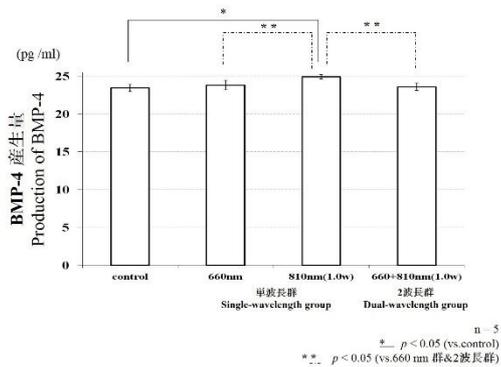
歯髄細胞は、レーザー照射後、すべての群において細胞数の増加が認められた。すなわち 24 時間後の細胞数では、2 波長群は 660 nm 群と比較し有意に少なかった ($p < 0.05$)。一方、48 時間後の細胞数では、2 波長群は control 群および 810 nm 群と比較し、有意に増加していた ($p < 0.05$)。72 時間後の単波長照射した 2 群の細胞数においてはコントロール群と比較し、有意な増加が認められた ($p < 0.05$)。しかしながら、2 波長群の細胞数はコントロール群と比較して有意な増加を認めなかった ($p > 0.05$)。さらに単波長照射した 2 群は、2 波長群と比較し有意な細胞数の増加を認めた ($p < 0.05$) (図 5)。

b) BMPs のタンパク質発現の検索



【図 6a BMP-2 タンパク産生量】

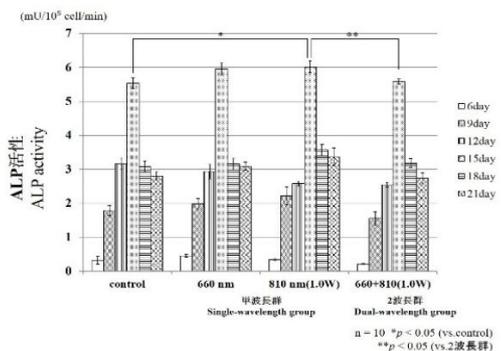
BMP-2 産生量は、照射 48 時間後の細胞上清において、単波長照射した 2 群はコントロール群と比較し有意な増加を認めた ($p < 0.05$)。しかしながら、2 波長群はコントロール群と比較し、有意な BMP-2 産生量の増加を認めなかった ($p > 0.05$) (図 6a)。



【図 6b BMP-4 タンパク産生量】

また、BMP-4 産生量は、照射 48 時間後の細胞上清において、810 nm 群はコントロール群との間に有意な増加を認め ($p < 0.01$)、さらに 2 波長群および 660 nm 群との間においても有意な増加を認めた ($p < 0.05$) (図 6b)。

c) ALP 活性

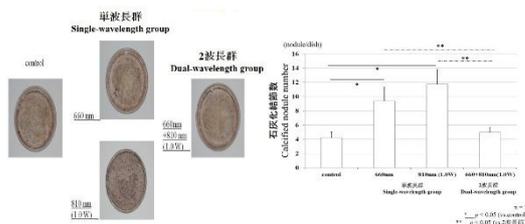


【図 7 ALP 活性】

ALP 活性は、レーザー照射後すべての群において 15 日目をピークとし、経時的に上昇が認められた。15 日目の ALP 活性において、810 nm 群はコントロール群および 2 波長群との

間に有意な活性上昇を認めた($p < 0.05$) (図 7)。

d) von Kossa 染色および石灰化結節数の測定



【図 8 von Kossa 染色および石灰化結節数】

レーザー照射から培養 40 日目の von Kossa 染色において, 810 nm 群 > 660 nm 群 > 2 波長群 > コントロール群の順に von Kossa 陽性反応が認められた。また, 実体顕微鏡下での石灰化結節数を計測した結果, 単波長照射した 2 群はコントロール群および 2 波長群と比較し, 石灰化結節数が有意に多かった ($p < 0.05$) (図 8)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

小峯 千明, 深井 譲滋, 小倉 由希, 大塚 一聖, 小西 賀美, 洪 性文, 淵上 真奈, 深津 晶, 若見 昌信, 村上 洋, 辻本 恭久, 平山 聡司, 松島 潔, 福本 雅彦

半導体レーザー単波長照射と 2 波長同時照射が培養ヒト歯髄由来細胞における硬組織形成能に及ぼす影響, 日大口腔科学, 査読有, 42 巻, 2016, 80-88

〔学会発表〕(計 1 件)

小峯 千明, 景山 万貴子, 大塚 一聖

抗菌的光線力学療法における殺菌メカニズムの解明, 第 28 回日本レーザー歯学会総会・学術大会, 2016 年 7 月 16 日, ウィンクあいち, 愛知県名古屋市

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小峯 千明 (KOMINE Chiaki)

日本大学・松戸歯学部・助教

研究者番号: 60708577

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし