

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：32703

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21454

研究課題名(和文) 歯周病原細菌取込み色素を利用した抗菌光線力学療法の基礎解析

研究課題名(英文) Basic analysis of antibacterial photodynamic therapy using periodontal pathogenic bacterium uptake pigment

研究代表者

吉田 彩佳 (YOSHIDA, AYAKA)

神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・特別研究員

研究者番号：00609414

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)：近年、抗菌光線力学療法(aPDT)の歯周病治療に応用され注目を集めているが、現法は色素染色により光励起に誘導された活性酸素種(ROS)による細胞毒性を引き起こす。歯周病原細菌を用い、細菌のエネルギー代謝に用いられる色素を応用したaPDTの効果を検討した所、細菌固有色素を光照射によって励起、ROSの産生とDNAに対する酸化障害による殺菌効果が認められた。今回の検討により現在用いられている方法よりも生体への影響が少なく、細菌に対する殺菌効果の高い治療法の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In recent years, the periodontitis treatment of antibacterial photodynamic therapy (aPDT) has attracted attention. The current method causes cytotoxicity by reactive oxygen species (ROS) induced by photoexcitation by dye staining. I investigated aPDT used for energy metabolism of periodontal pathogenic bacteria. It was examined that the effects of aPDT using pigment used for energy metabolism of periodontal pathogenic bacteria. It was recognized that bacterial peculiar pigment was excited and produced ROS by light irradiation. It caused bactericidal effect due to oxidation damage to DNA. According to this study, it was suggested that this aPDT has less influence on the living body than the method currently used and a possibility of a treatment method with high bactericidal effect against bacteria.

研究分野：医歯薬学

キーワード：青色光 *Prophyromonas gingivalis* 抗菌光線力学療法

1. 研究開始当初の背景

光線力学療法(Photo Dynamic Therapy; PDT)は、すでに国内で1996年に肺・胃・食道・子宮頸部・膀胱癌、2014年に脳腫瘍の保険収載が行われ、米国でも米国食品医薬品局(FDA)により2003年に一部光感受性薬のPDT使用が承認されている。また、2003年に厚生労働省は欧米諸国で眼科PDT治療に用いる光感受性物質と半導体レーザーに対しても国内承認し、加えて日本眼科学会は適切な実施と光曝露による副作用誘引防止のガイドラインを定めた。この施術必須条件は日本眼科学会が認定した然るべき講習会を受講・認定されていることである(*日本眼科学会誌*, **108**(4): 234-236, 2004)。歯科臨床においても抗菌PDT(aPDT)として歯周病治療への応用が開始し広く注目を集めている。aPDTは、主に色素(メチレンブルー)染色を標的細菌に施し、赤色光(670 nm)照射を行うことで色素光励起により生成された活性酸素種(ROS)による殺菌治療法である(*J Periodontol*, **78**(6): 965-973, 2007, *J Clin Periodontol*, **35**: 877-884, 2008)。しかし、従来型aPDTは染色不能なデブライドメント不良部位に対する殺菌効果が得られず、さらにメチレンブルーは生体の生細胞の核をも染色し(*Hum Reprod*, **13**(12): 3414-3417, 1998)光励起に誘導されたROSによる細胞毒性を引き起こす。また、従来型aPDTは開業医主導の臨床報告が主であり、殺菌メカニズムや安全性に対する基礎的研究はほとんど行われていない(*J Periodontol*, **80**(11): 1790-1798, 2009)。加えて歯周病に対するaPDTの治療ガイドラインの設定にも至っていないため、歯科aPDTは厚生労働省の承認を未だ受けていない形で患者に提供されている。

2. 研究の目的

aPDTの代表的な方法は、標的細菌を染色し光を当てることで生じる活性酸素種を利用し殺菌するものである。しかし従来型aPDTは、血液や浸出液が染色剤の侵入を妨げ、また、デブライドメント不良部位は染色不能なため殺菌効果が減弱される。この欠点を打破するため、歯周病原細菌がポルフィリン骨格を含むヘムを宿主細胞より取込み代謝することに着目し、宿主細胞に影響が認められず細菌が自ら増殖のために周囲環境に影響されずポルフィリン色素を利用した抗菌光線力学療法の基礎解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

3-1. 光源の設定

ブルーライト光源に発光ダイオード(LED, Techno Light KDL-100)を用い、青色光フィルター(225S-SPF500, Kenko Tokina)にて波長460 nm, 出力400 mW/cm²となるように設定した。

3-2. 細菌培養

実験には、*Porphyromonas gingivalis* (P.g.) ATCC33277株を使用し、ブレインハートインフュージョン培地にイースト抽出物、ヘミンおよびビタミンK1を添加した培地あるいは5%ヒツジ脱繊維血を含むBHI血液寒天培地を用いて通法に則り培養を行った。

3-3. プロトポルフィリン IX (PpIX) の光照射による発光の検討

1 mM PpIXにおける青色光照射による発光をExemplar (BRC115P, B&W TEK, Newark, DE, USA)を用いて測定した。

3-4. 活性酸素種の検討

PpIXが青色光照射により産生する活性酸素種の検討を、電子スピン共鳴法を用い、JES-RE1X (JEOL, Tokyo, Japan)にて測定した。

3-5. 光照射による細菌の発光の検討

P.g.を培養後、PBSにてWashし、OD_{550nm} 0-1.0まで0.1間隔で用意し、これらを96 wellプレートに添加し、infiniteM200 (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland)を用い、3-3.にて得られた励起蛍光波長にて測定を行った。

3-6. 光照射による細菌の殺菌効果の検討

P.g.を培養後OD_{550nm} 0.6に調整後96 wellプレートに添加し、光照射を行い、その後通法に則り5日間培養し殺菌効果を検討した。

3-7. 光照射による細菌の酸化ストレス測定

P.g.を培養後、OD_{550nm} 0.6に調整後24 wellプレートに添加し、光照射を行い、その後酸化ストレス測定をCellROX® Green Reagents (Promega Corporation, Madison, WI, USA)およびDNA/RNA Oxidative Damage ELISA kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI)を用い、通法に則り測定を行った。

4. 研究成果

ポルフィリンにより生成されるROS産生の解析

PpIXは従来のPDTにおいては、赤色光による励起を応用しているが、青色光を照射することによっても励起発光した。この励起発光を応用し、P.g.内に同様物質の存在を検討した結果、P.g.が増殖に応用するポルフィリンはPpIX様物質であり、これは細菌数依存的に増加することが判明した。また、このPpIXは活性酸素種の検討から青色光照射によりPpIXが励起され、一重項酸素の産生を認めた。

歯周病原細菌殺菌効果の解析

青色光を照射することによってP.g.は照射強度依存的に殺菌されることが判明した。また、この殺菌は、酸化ストレス測定を用いた

検討によって細菌 DNA の酸化によることが判明した。以上より、細菌体内の PpIX が青色光照射によって励起され活性酸素種を産生、この活性酸素種によって細菌の DNA は酸化ストレスを受け、DNA 損傷し細菌の殺菌に寄与することが示唆された。

現在歯科において、生体細胞をも染色する色素を用いた aPDT を用いられているが、今回の研究によって、細菌が持つ色素を応用することで、生体為害性のより少ない aPDT 開発の可能性が示唆された。

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 8 件)

Ibi H, Hayashi M, Yoshino F, Tamura M, Yoshida A, Kobayashi Y, Shimizu K, Lee M-C, Imai K, Ogiso B: Bactericidal effect of hydroxyl radicals generated by the sonolysis and photolysis of hydrogen peroxide for endodontic applications. *Microbial Pathogenesis*, **103**, 65-70, 2017. 査読有
DOI:10.1016/j.micpath.2016.12.010

Shirai R, Miura T, Yoshida A, Yoshino F, Ito T, Yoshinari M, Yajima Y: Antimicrobial effect of titanium dioxide after ultraviolet irradiation against periodontal pathogen. *Dental Materials Journal*, **35** (3), 511-516, 2016. 査読有
DOI:10.4012/dmj.2015-406

Tanaka Y, Toyama T, Wada-Takahashi S, Sasaki H, Miyamoto C, Maehata Y, Yoshino F, Yoshida A, Takahashi S-S, Watanabe K, Lee M-C, Todoki K, Hamada N: Protective effects of (6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin on local ischemia/reperfusion-induced suppression of reactive hyperemia in rat gingiva. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, **58** (1), 69-75, 2016. 査読有
DOI:10.3164/jcfn.15-69

Funaki S, Tokutomi F, Wada-Takahashi S, Yoshino F, Yoshida A, Maehata Y, Miyamoto C, Toyama T, Sato T, Hamada N, Lee M-C, Takahashi S-S: *Porphyromonas gingivalis* infection modifies oral microcirculation and aortic vascular function in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHRSP). *Microbial Pathogenesis*, **92**, 36-42, 2016. 査読有
DOI:10.1016/j.micpath.2015.12.009

Yoshino F, Yoshida A, Toyama T,

Wada-Takahashi S, Takahashi S-S: α -glucosyl hesperidin suppressed the exacerbation of 5-fluorouracil-induced oral mucositis in the hamster cheek pouch. *Journal of Functional Foods*, **21**, 223-231, 2016. 査読有
DOI:10.1016/j.jff.2015.12.008

Maehata Y, Miyamoto C, Tsukinoki K, Takahashi S, Yoshino F, Wada-Takahashi S, Yoshida A, Tanaka A, Adachi T, Igoshi N, Shiba T, Kishikawa N, Imazato T, Suzuki I, Ihara H, Shimomura J, Okabe H, Yanagisawa T, Hosho A, Maehata E: Foresight of physical development indicated by the National Health and Nutrition Survey in Japan: An approach in terms of biomedical sciences. *International Journal of Analytical Bio-Science*, **3**(3), 63-72, 2015. 査読有

Tamaki N, Yoshino F, Fukui M, Hayashida H, Yoshida A, Kitamura M, Iwasaki T, Furugen R, Kawasaki K, Nakazato M, Maeda T, Koheguchi S, Yamamoto T, Lee M-C, Ito H, Saito T: Relationship among salivary antioxidant activity, cytokines and periodontitis: the Nagasaki Island study. *Journal of Clinical Periodontology*, **42**(8), 711-718, 2015. 査読有
DOI:10.1111/jcpe.12438

Yoshida A, Shiotsu-Ogura Y, Wada-Takahashi S, Takahashi S-S, Toyama T, Yoshino F: Blue light irradiation-induced oxidative stress in vivo via ROS generation in rat gingival tissue. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **151**, 48-53, 2015. 査読有
DOI:10.1016/j.jphotobiol.2015.07.001

[学会発表](計 14 件)

Toyama T, Fujioka J, Koyata Y, Sakuma T, Watanabe K, Sasaki H, Yoshino F, Yoshida A, Tsukiyama K, Hamada N: Antibacterial Activity of Infrared Free Electron Laser on Cariogenic Bacteria, 95th General session & Exhibition of the IADR, 46th Annual meeting of the AADR and 41th Annual meeting of the CADR, San Francisco, CA, USA, 2017.3.22-25.

平野頼是, 林 誠, 田村宗明, 吉野文彦, 吉田彩佳, 小林慶美, 井比陽奈, 増淵光暁, 小木曾文内: 大気利用プラズマ発生装置を応用した新たな根管消毒法の基礎的検討. 第 18 回日本口腔機能水学会学術大会, 千代田区, 2017. 3.11-12.

井比陽奈, 林 誠, 吉野文彦, 田村宗明, 吉田彩佳, 平野頼是, 小林慶美, 今井健一, 小木曾文内: 超音波分解と光分解によって過酸化水素から生成されるヒドロキシラジカルによる歯内療法条件下における殺菌効果. 第 18 回日本口腔機能水学会学術大会, 千代田区, 2017. 3.11-12.

吉田彩佳, 小椋有香子, 高橋聡子, 高橋俊介, 遠山歳三, 吉野文彦: 青色発光ダイオード照射はラット口蓋歯肉の酸化ストレスを亢進する. 神奈川歯科大学学会 第 51 回総会, 横須賀市, 2016.12.03.

吉野文彦, 吉田彩佳, 小椋有香子, 遠山歳三, 高橋聡子, 高橋俊介: ガン化学療法に併発する口内炎に対する糖転移ヘスペリジンの効果. 神奈川歯科大学学会 第 51 回総会, 横須賀市, 2016.12.03.

遠山歳三, 古屋田泰徳, 藤岡 隼, 佐々木悠, 吉野文彦, 吉田彩佳, 渡辺清子, 佐久間隆章, 今井貴之, 小野善弘, 築山光一, 浜田信城: 赤外自由電子レーザーの口腔細菌に対する殺菌効果の検討. 神奈川歯科大学学会 第 51 回総会, 横須賀市, 2016.12.03.

平野頼是, 林 誠, 田村宗明, 吉野文彦, 吉田彩佳, 小林慶美, 井比陽奈, 増淵光暁, 小木曾文内: 新規根管消毒法に関する基礎的研究—大気を利用したプラズマ発生装置を使用した根管消毒法の検討—日本日本歯科保存 2016 年度春季学術大会(第 144 回), 宇都宮, 2016. 6. 9-10

Yoshida A, Yoshino F: Study of Blue-light Effect on rat palatal gingiva. 45th Annual meeting of the AADR, Los Angeles, CA, USA. 2016.3.16-19

Ibi H, Hayashi, Yoshino F, Yoshida A, Kobayashi Y, Tamura M, Ochiai K, Ogiso B, Lee M: Disinfection for Endodontic Treatment by Ultrasound/LED Activation of H2O2. 45th Annual meeting of the AADR, Los Angeles, CA, USA. 2016.3.16-19

Maehata Y, Miyamoto C, Yoshino F, Ozawa S, Takahashi SS, Wada-Takahashi S, Yoshida A, Izukuri K, Hata R, Tsukinoki K: Scavenger of reactive oxygen species is effective for the inhibition of angiogenesis and tumor proliferation in human head and neck squamous cell carcinoma cells by regulation gene expression of chemokines. The 13th Asia Pacific Federation of Pharmacologist (APFP) Meeting, Bangkok, Taiwan, 2016.2.1-3.

田中優作, 遠山歳三, 高橋聡子, 佐々木悠, 宮本千央, 前畑洋次郎, 吉野文彦, 吉田彩佳, 高橋俊介, 渡辺清子, 李昌一, 塗々木和男, 浜田信城: Protective effects of (6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin on local ischemia/reperfusion-induced suppression of reactive hyperemia in rat gingiva. 第 148 回 神奈川歯科大学学会例会, 横須賀, 2015.10.8

一瀬昭太, 小松知子, 岩崎克夫, 小野弓絵, 水村宗護, 吉野文彦, 吉田彩佳, 宮城 敦, 李 昌一: 嚙下体操がヒト唾液抗酸化能に及ぼす影響. 第 148 回 神奈川歯科大学学会例会, 横須賀, 2015.10.8

井比陽奈, 林 誠, 吉野文彦, 田村宗明, 吉田彩佳, 李 昌一, 平野頼是, 小林慶美, 落合邦康, 小木曾文内: 新たな根管清掃・消毒法に関する基礎的研究 - 超音波と LED の照射が過酸化水素水の活性酸素種生成に及ぼす影響. 第 142 回 日本歯科保存学会 2015 年度春季学術大会, 北九州市, 2015.6.25-26.

吉田彩佳, 小椋有香子, 高橋俊介, 高橋聡子, 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, 吉野文彦: 青色 LED 照射がラット口腔領域に及ぼす影響の検討. 第 15 回 日本抗加齢医学会総会, 福岡市, 2015. 5. 29-31.

〔総説〕(計 1 件)

吉田彩佳, 木本克彦, 吉野文彦: 青色光の口腔組織への影響 - 歯科治療に使用する青色光は安全か?. デンタルダイアモンド, 5, 152-155, 2015.

〔その他〕

賞
吉田彩佳, 小椋有香子, 高橋聡子, 高橋俊介, 遠山歳三, 吉野文彦: 優秀論文賞(檜垣賞): Blue light irradiation induced oxidative stress in vivo via ROS generation in rat gingival tissue. 神奈川歯科大学学会 第 51 回総会, 2016.12.3.

ホームページ等

<http://www.labs.kdu.ac.jp/pmd/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉田彩佳 (AYAKA YOSHIDA)

神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・特別研究員

研究者番号: 00609414