

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09584

研究課題名(和文) 抗菌的光線力学療法を用いた象牙質齲蝕の新たな殺菌法の開発と深在性齲蝕治療への応用

研究課題名(英文) Development of new sterilization method using the antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) for dentin caries and application of the new method to deep caries treatment

研究代表者

新海 航一 (Shinkai, Koichi)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・教授

研究者番号：90147843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、齲蝕原性菌である *Lactobacillus acidophilus* を人工的に感染させた象牙質片を用い、新規に開発した4種類の抗菌的光線力学療法(aPDT)の殺菌効果を検討した。いずれのaPDTも殺菌性をもつ活性酸素を多く放出したが、最も有効な殺菌力を示したのは、光感受性色素のブリリアント・ブルーと波長650nmの半導体レーザー照射の組合せであった。また、aPDTの応用は、象牙質とコンポジットレジン(修復材料)の接着強さを有意に低下させることはなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果では、齲蝕原性菌の1つである *Lactobacillus acidophilus* を感染させた象牙質プレートにブリリアント・ブルーを塗布し波長650nmの半導体レーザーを照射した結果、感染象牙質プレートに対する有意な殺菌性を示したことから、この組み合わせによる抗菌的光線力学療法が深在性齲蝕治療に応用できることが示唆された。象牙質齲蝕に対するこの新規殺菌法は、深在性齲蝕時における偶発露髄を回避し、国民の歯にとって重要な歯髄の温存が期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to examine bactericidal effects of the four kinds of new antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) on dentin plate infected with *Lactobacillus acidophilus*. The amount of reactive oxygen species in all aPDT groups was significantly higher than in the control. The total light emission amount in all groups applied with laser irradiation was significantly lower than that in the control. However, only 650nm laser with brilliant blue showed significantly lower colony counts than the control. 650laser-BB was the most effective in sterilizing the infected dentin plates. The application of the aPDT did not affect the dentin bond strength of composite resin to dentin.

研究分野：歯学

キーワード：抗菌的光線力学療法 象牙質齲蝕 殺菌法 半導体レーザー 光感受性色素 象牙質接着強さ 活性酸素 深在性齲蝕治療

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

歯科における光線力学療法 (Antimicrobial Photo dynamic therapy : aPDT) に関する基礎研究は、歯内、歯周および口腔外科の各領域で遂行され、多くのエビデンスを獲得することにより PDTが臨床応用されている。また、齶蝕原性菌 (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Lactobacillus acidophilus* など) に対する aPDT の直接的な殺菌効果は、寒天培地やレジンプレートを使った基礎研究で明らかにされているが、感染象牙質内の殺菌効果に関しては未解明の点が多く、齶蝕治療への aPDT の臨床応用は現在ほとんど行われていない。基礎研究では、より臨床に近似したシミュレーション下で実施することが肝要であり、人工的に作製した齶蝕象牙質を用いて齶蝕原性菌に対する aPDT の殺菌効果を調べるのが望ましい。そこで、*Streptococcus mutans* を使った齶蝕象牙質プレートに対する aPDT (各種半導体レーザーと各種光感受性色素の組合せ) の殺菌効果を調べた先行研究の成果では、臨床での有用性が示唆された。本研究では、aPDT を応用した深在性齶蝕治療の実現に向けて、さらに多くのエビデンスの獲得を目指した。また、従前の研究で使用された aPDT は、光感受性色素とレーザー光や LED 光の組合せが多様で、殺菌効果にもばらつきがみられた。光感受性色素の濃度、レーザー光や LED 光の強度および効果的な組合せなど、詳細を明らかにすることが必須なため、齶蝕治療に aPDT を適応するには、基礎研究でさらに多くの点を検討する必要があると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、*in vitro* で作製した感染象牙質プレートを用い、aPDT (各種半導体レーザーと各種色素液を使用) の *Lactobacillus acidophilus* に対する殺菌効果を明らかにすること、ならびに aPDT 応用後の感染象牙質プレートに対するコンポジットレジンの接着強さを測定し、aPDT の象牙質接着への影響を明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

(1) ウシ抜去下顎前歯を用いて約  $3 \times 3 \times 1$  mm の象牙質プレートを作製し、プレートの表面をリン酸水溶液で処理し象牙細管を開口させた後、オートクレーブを用いて滅菌した。96 マルチウェルプレートに象牙質プレートを静置し、吸光度 0.3 に調節した *Lactobacillus acidophilus* の菌液を、象牙質プレート上に分注した。遠沈を行った後、12 時間培養して感染象牙質プレートを完成した。半導体レーザーは、波長 940 nm (940 laser) と波長 650 nm (650 laser) を使用した。光増感剤は、Brilliant Blue の 1% sPBS 溶液 (BB) と Acid Red の 1% sPBS 溶液 (AR) を使用した。実験群は 650 laser、940 laser、BB、AR、650 laser-BB、650 laser-AR、940 laser-BB、940 laser-AR、および Control (無処理) の 9 群とした。処置終了後、象牙質プレートを sPBS 溶液中に浸漬し、超音波発生機で *L. acidophilus* を剥離した。10 倍まで段階希釈を行って BHI 寒天培地に塗抹した後、48 時間培養して Colony count を行った。また、ATP 測定キットと LUMIPHOTOMETER を用いて各実験

群における処置終了直後のATP assayも測定した。さらに、各実験群の試料（代表1例）を処置終了直後に固定、凍結乾燥したものをPd-Pt蒸着し、高倍率で試料表面のSEM観察を行った。

(2) Isometを用いてウシ抜去下顎前歯をトリミングし、約6×6×2mmの象牙質プレートを作製した。象牙質プレートの表面を40%リン酸水溶液で脱灰して象牙細管を開口させ、超音波洗浄を行った後、オートクレーブを用いて滅菌した。BHI液体培地で *Streptococcus mutans* を培養し、吸光度0.3になるように菌液の濃度を調整した。この菌液に象牙質プレートを浸漬し、12時間培養したものを感染象牙質プレートとした。材料はメガボンド2、マジスティESフロー、1% Brilliant blue溶液 (BB)、アクセル (Acc)、および半導体レーザー (Pad Light)を用いた。実験群はaPDT (BB塗布 レーザー照射 水洗、乾燥 プライマー塗布 エアブロー ボンディング塗布 光照射 コンポジットレジン充填 光照射) PDT + Acc (BB塗布 レーザー照射 水洗、乾燥 Acc塗布 水洗、乾燥 プライマー塗布 エアブロー ボンディング塗布 光照射 コンポジットレジン充填 光照射) およびコントロール (プライマー塗布 エアブロー ボンディング塗布 光照射 コンポジットレジン充填 光照射) の3群について各々接着試料を作製した (n = 10)。剪断接着強さ試験は、小型卓上試験機 (EZTest 500N) を用い、各実験群の接着試料の剪断接着試験強さを測定した。(1)と(2)の実験における実験群間の有意差は、ともにKruskal-Wallis検定とSteel-Dwass検定を用いて検定した。

#### 4. 研究成果

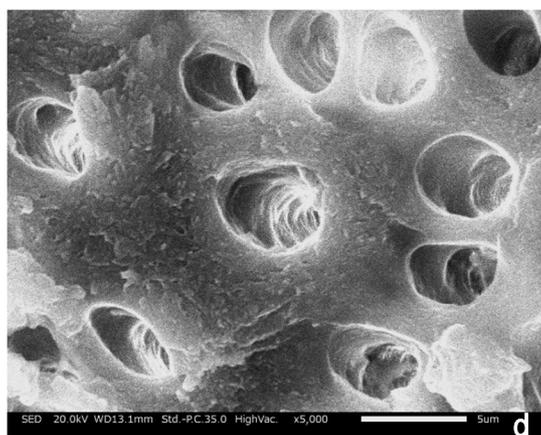
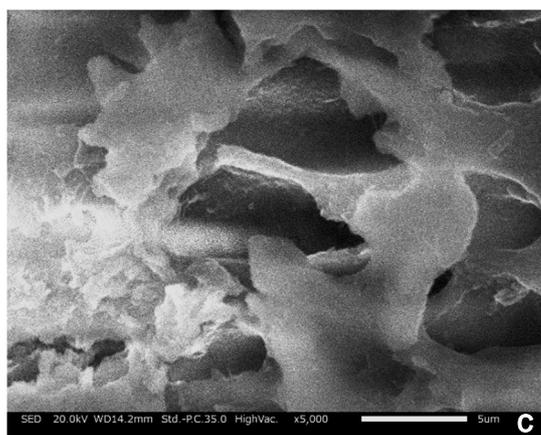
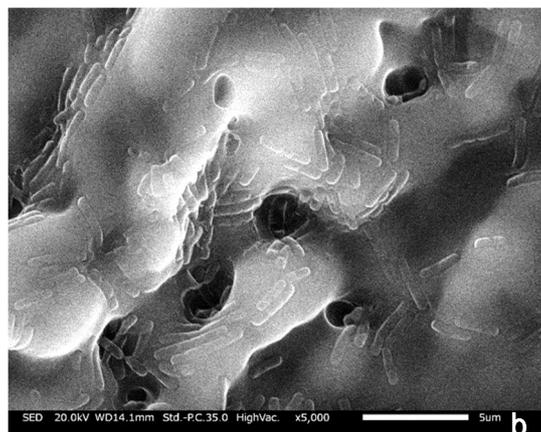
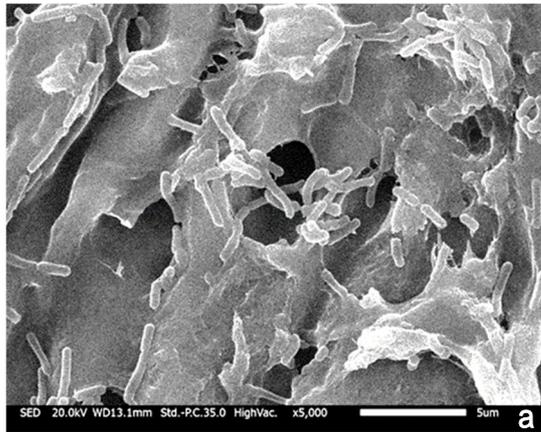
(1) 各実験群における処置終了48時間後のColony count (CFU) の結果 (平均 ± SD × 10<sup>3</sup>/ml) と殺菌処置終了直後のATP assay (RLU) の結果 (平均 ± SD) を表に示す。Controlと比較して650laser-BBは細菌数が有意に少なかった (p < 0.05) が、650laser-BB以外の実験群は、有意差を認めなかった (p > 0.05)。一方、殺菌処置終了直後のATP assayの結果では、controlと比較してBBとAR以外の実験群は測定値が有意に小さかった (p < 0.05)。

コントロール (a)、650laser (b)、BB (c) および650laser-BB (d) の試料表面のSEM像 (5,000倍) を図に示す。650laserとBBでは、コントロールと同様に、*Lactobacillus acidophilus* が数多く認められるが、650laser-BBではほとんど認められない。

これらのことから、レーザー照射群は *Lactobacillus acidophilus* に対して照射直後に有意な殺菌効果を示すが、650laser-BB以外の殺菌法では48時間後に *Lactobacillus acidophilus* の活性化がみられ、殺菌効果が不十分であることが明らかとなった。

したがって、本実験で設定したaPDTでは、650nmの波長をもつ半導体レーザーとBrilliant Blueの1% sPBS溶液の組合せが、*Lactobacillus acidophilus* 感染象牙質プレートに対して最も有効な殺菌効果をもつことが示唆された。

実験群	Colony count	ATP assay
	CFU (Mean $\pm$ SD $\times 10^3$ /ml)	RLU (Mean $\pm$ SD)
650laser	38.7 $\pm$ 23.6 <sup>abc</sup>	7.38 $\pm$ 2.78 <sup>c</sup>
940laser	40.3 $\pm$ 19.3 <sup>bc</sup>	9.12 $\pm$ 4.23 <sup>c</sup>
BB	48.4 $\pm$ 15.7 <sup>c</sup>	20.62 $\pm$ 9.29 <sup>d</sup>
AR	39.4 $\pm$ 20.1 <sup>abc</sup>	21.45 $\pm$ 12.07 <sup>cd</sup>
650laser-BB	18.1 $\pm$ 14.0 <sup>a</sup>	0.03 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>
650laser-AR	23.6 $\pm$ 17.2 <sup>ab</sup>	0.02 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>
940laser-BB	23.8 $\pm$ 8.9 <sup>ab</sup>	2.62 $\pm$ 0.48 <sup>b</sup>
940laser-AR	26.6 $\pm$ 16.4 <sup>abc</sup>	2.29 $\pm$ 0.48 <sup>b</sup>
control	44.1 $\pm$ 12.2 <sup>bc</sup>	27.37 $\pm$ 10.33 <sup>d</sup>



(2)各実験群の接着強さ(平均値±SD、MPa)は、aPDT:28.14±6.71、aPDT+Acc:25.88±2.65、コントロール:31.27±6.52であった。いずれの実験群間にも有意差は認められなかった(p>0.215)。aPDT後では、残留酸素の影響による象牙質接着強さの低下を危惧したが、若干の低下は認められるものの有意な低下を示さなかった。

<引用文献>

Nagai Y, Suzuki A, Katsuragi H, Shinkai K. Effect of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) on the sterilization of infected dentin in vitro. *Odontology*. 2018; 106: 154-161. <https://doi.org/10.1007/s10266-017-0321-6>.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Daiki Yoshii, Hiroaki Katsuragi, Koichi Shinkai	4. 巻 109
2. 論文標題 Bactericidal effect of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) on dentin plate infected with Lactobacillus acidophilus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Odontology	6. 最初と最後の頁 67-75
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10266-020-00532-w	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉井大貴、新海航一、葛城啓彰
2. 発表標題 半導体レーザーと光増感剤を用いた抗菌的光線力学療法の乳酸桿菌に対する殺菌効果
3. 学会等名 日本レーザー歯学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉井大貴、新海航一、葛城啓彰
2. 発表標題 L. acidophilus感染象牙質プレートに対する抗菌的光線力学療法の殺菌効果
3. 学会等名 日本歯科保存学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉井大貴、新海航一、葛城啓彰
2. 発表標題 半導体レーザーと光感受性色素の組合せが一重項酸素の発生量に及ぼす影響
3. 学会等名 日本歯科保存学会
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	海老原 隆  (Ebihara Takashi)  (40287777)	日本歯科大学・新潟生命歯学部・准教授   (32667)	
研究 分担者	川嶋 里貴  (Kawashima Satoki)  (30779781)	日本歯科大学・新潟生命歯学部・非常勤講師   (32667)	

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
---------	---------