

令和 4 年 4 月 27 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：18K09894

研究課題名(和文) 抗菌光線力学療法を応用した誤嚥性肺炎コントロール 新規口腔カンジダ症予防法の開発

研究課題名(英文) Control of Aspiration Pneumonia with Antimicrobial Photodynamic Therapy - A Novel Method of Preventing Oral Candidiasis

研究代表者

吉田 彩佳 (Yoshida, Ayaka)

神奈川歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：00609414

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)：高齢者の誤嚥性肺炎の原因の一つである常在菌のカンジダ菌は、抗真菌剤による治療を施しても多くが再発する。新たな根本的治療法を開発するため、歯周病治療で近年注目を浴びている抗菌光線力学療法(aPDT)の応用を検討した。歯科で歯垢染色液として使用されている色素を用い、この色素に光照射を行うことにより、色素が励起し活性酸素種の産生とタンパク質に対する酸化障害による殺菌効果が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、口腔内の真菌に対する治療は口腔ケアと抗真菌薬の治療のみであった。今回の検討によりカンジダ菌に対する新規の殺菌効果の高い治療法の可能性が示唆された。このことから、新たな真菌治療に対するセルフケアアプローチの可能性が見出された。しかしながら本研究は基礎検討であることから今後臨床応用に向けたさらなる検討も必要である。

研究成果の概要(英文)：Candida, an endemic fungus, is one of the causes of aspiration pneumonia in the elderly, and many cases recur even after treatment with antifungal agents. In order to develop a new fundamental treatment method, we investigated the application of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT), which has recently been attracting attention in the treatment of periodontal disease. Irradiation of the dye, which is used as a dental plaque stain, showed bactericidal effects due to the production of reactive oxygen species (ROS) and oxidative damage to proteins. This study suggests the possibility of a new highly effective bactericidal treatment for Candida.

研究分野：医歯薬学

キーワード：抗菌光線力学療法 歯垢染色液色素 Candida albicans

1. 研究開始当初の背景

我が日本における 65 歳以上の高齢者率は、2016 年時点で全人口の 1/4 を超える 27.3% (平成 29 年度版内閣府高齢社会白書) であり、世界中どの国も経験したことのない超高齢社会を迎えている。日本の死亡原因は依然として癌や心疾患が上位を占める。しかしながら年齢階級別で見ると高齢者階級の肺炎による死亡が急激に増加 (図 1; 厚生労働省平成 27 年度人口動態統計調査) しており、肺炎の 80% 以上は誤嚥性肺炎によるものと言われている (老年歯学, 28: 366-368, 2014)。誤嚥性肺炎は、異物が気管に入り肺で微生物が繁殖し呼吸不全に陥るため、高齢者の生活において注意する必要がある最重要事項の一つとして挙げられている。

口腔内には多種多様な微生物が存在 (口腔フローラ) しており、その中でも *C. albicans* は、健常者においても 3-75% に見られる代表的な口腔常在菌であるが、特に高齢者で口腔カンジダ症の発症割合が非常に多い現状がある。口腔カンジダ症それ自体は直接死亡原因とは成りえないが、口腔内 *C. albicans* の繁殖によって誤嚥性肺炎のリスクは非常に高まる。その結果、誤嚥性肺炎治療のために費やされる医療費は、実に年間 4,450 億円にもものぼると報告されており (老年歯学, 28: 366-368, 2014)、誤嚥性肺炎の予防は国民の QOL を高めるのみならず、医療費削減のためにも社会的意義が高い。高齢入院患者への口腔ケアの実施が積極的に遂行されてきた結果、肺炎発症の減少や抗菌薬使用頻度の減少に口腔ケアが寄与するとの報告もある (老年歯学, 28: 69-78, 2013, 日本老年医学, 38: 476-477, 2001)。しかしながら、高齢者の口腔ケア自立度は、身体的・精神的な加齢変化が生じるに伴い低下するため、口腔ケアの実施の多くは介護者に依存しており、介護負担の割合が増大している。さらに、介護者による口腔ケアは技術的難しさ、要介護高齢者の非協力、重要性の知識欠如から口腔ケアは必ずしも適切に実行されていない (老年歯学, 16(3): 366-371, 2002)。

2. 研究の目的

我が国の死因第 3 位の肺炎患者の大多数を占める高齢者は、健康成人と比較し口腔内に様々な日和見感染微生物が高率に存在し、これらが誤飲の起因となり不顕性誤嚥によって肺炎を発症する (老年歯学 25(3): 289-296; 2010)。よって本研究の目的は、誤嚥性肺炎の原因となる口腔内日和見感染微生物の代表である *C. albicans* を減少させる適切なコントロール法、すなわち抗菌光線力学療法を応用した新たなセルフ口腔ケアシステムの確立である。

3. 研究の方法

(1) 光源の設定

光源に発光ダイオード (Kenko Techno Light KDL-100 225S-SPF500) もしくは発光ダイオード (Kenko TECHNO LIGHT KTS-150 Green) を用いた。

(2) 歯垢染色液色素

歯垢染色液色素は、ローズベンガル、エリスロシン、フロキシシンを用いた。

(3) 真菌培養

実験には *Candida albicans* (*C. albicans*) ATCC10231 株を使用し、通法に則り培養を行った。

(4) 活性酸素種 (ROS) の検討

各種歯垢染色液の各種濃度が光照射の各種出力により産生する ROS の検討を、電子スピン共鳴法を用い JES-REX1X (JEOL, Tokyo, Japan) にて測定した。

(5) グルカンの検討

培養した *C. albicans* を PBS で wash し、OD₆₀₀=1.4 に調整後、96 well プレートに添加、色素染色を施し、光照射を行った後、ファンギテック®G テスト MK II 「ニッスイ」(日水製薬株式会社) を用いプロトコールに従い測定を行った。

(6) 光線力学療法による真菌殺菌効果の検討

C. albicans を培養後 PBS で wash し OD₆₀₀=1.4 に調整。96 well プレートに添加し色素染色を施し光照射を行った。その後通法に則り培養し殺菌効果を検討した。

(7) 光線力学療法による酸化ストレス測定

C. albicans を培養後 PBS で wash し OD₆₀₀=1.4 に調整後、24 well プレートに添加、色素染色を施し光照射を行った。その後、タンパク質を抽出し Western blot 法にてカルボニル化の検討をした。

4. 研究成果

(1) 歯垢染色液の光励起により産生される ROS の解析

ローズベンガル、フロキシシン、エリスロシンいずれにおいても ROS の一つである活性酸素種を産生した。歯垢染色液濃度および出力が高いほどその産生量は増加し、特にフロキシシンによる産生が有意であったことから、今後の実験はこのフロキシシンによる検討を行った。

(2) 真菌細胞の抗酸化物質に対する光線力学療法の検討結果

真菌細胞膜上の抗酸化物質である (1→3)-β-D-glucan に対する効果は、光照射単体、フロキシシン添

加単体では減少効果は認められなかったが、光照射およびフロキシシン添加両者の存在下では有意にグルカンの減少が認められた。

(3) 真菌殺菌効果の検討

グルカンの減少効果が認められた条件で真菌の CFU 測定の結果は、グルカン同様光照射単独、フロキシシン添加単独では CFU の抑制は認められなかったが、両者の存在下では有意な CFU の抑制効果が認められた。

(4) 光線力学療法による真菌に対する酸化ストレスの検討

グルカン測定・CFU 測定同様の条件下にて真菌のタンパク質の酸化すなわちカルボニル化の検討結果は、同様コントロールと比較し、フロキシシン添加単体、光照射単体ではカルボニル化の亢進が認められなかったが、両者の存在下におけるカルボニル化の亢進が認められた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Shiotsu-Ogura Y, Yoshida A, Kan P, Sasaki H, Toyama T, Izukuri K, Hamada N, Yoshino F	4. 巻 26
2. 論文標題 Antimicrobial photodynamic therapy using a plaque disclosing solution on Streptococcus mutans	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 Fumihiko Yoshino, Ayaka Yoshida	4. 巻 54
2. 論文標題 Effects of blue-light irradiation during dental treatment	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Japanese Dental Science Review	6. 最初と最後の頁 160 ~ 168
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdsr.2018.06.002	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉田彩佳
2. 発表標題 歯垢染色液色素を応用した新規歯周病治療法の基礎的解析
3. 学会等名 神奈川歯科大学学会 2020年学会総会
4. 発表年 2020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 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 小椋有香子, 甘 博文, 吉田彩佳, 佐々木悠, 居作和人, 浜田信城, 吉野文彦
2. 発表標題 歯垢染色液色素 Phloxine B を応用した Streptococcus mutans に対する抗菌光線力学療法の検討
3. 学会等名 神奈川歯科大学学会 第 53 回総会
4. 発表年 2018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 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

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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