

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K10140

研究課題名（和文）バイオフィーム抑制における新規抗菌光線力学療法システムの効果について

研究課題名（英文）Effect of new antimicrobial photodynamic therapy system on biofilm inhibition

研究代表者

林 潤一郎（Hayashi, Jun-ichiro）

愛知学院大学・歯学部・准教授

研究者番号：30350937

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）：我々が独自に開発を続けてきたインドシアニングリーン封入ナノ粒子と半導体レーザーを用いた抗菌光線力学療法のシステムが、歯周病バイオフィームに対し十分な殺菌効果を発揮するのかを *in vitro* モデルにて検討した。歯周病原細菌2菌種の混合バイオフィームを作成し、バイオフィームへの殺菌効果を確認したところ、歯周ポケット内照射を想定したモデルにおいては97%程度の、歯周ポケット外照射を想定したモデルでは99%以上の高い殺菌効果を示した。また、aPDTによる細菌の遺伝子発現への影響を調べたところ、酸化ストレス応答遺伝子である *oxyR*、*sod*、バイオフィーム形成に関連する *luxS* で発現低下が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が独自に開発を進めてきたICGナノ粒子を用いた歯肉外部照射法によるaPDTは、すでに人の歯周ポケットに対する臨床研究が進められており、本研究において、実験的にバイオフィームの細菌抑制に有効であることが確認されたことで、裏付けとなる基礎データの大部分が整うこととなる。aPDTは一般的に、現時点においては、単独処置における臨床成績が十分でないことが報告されており、より高い臨床効果が求められている。今後、臨床研究を重ね、我々の手法がより効果的であることが示されれば、歯周病治療において、薬剤耐性対策や、観血処置が困難な場合の有効なオプションとなることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined *in vitro* models to determine whether an antimicrobial photodynamic therapy system using indocyanine green-loaded nanoparticles and a semiconductor laser, which we have been developing independently, has sufficient bactericidal effect against periodontal biofilms. The results showed that the system demonstrated a bactericidal effect of approximately 97% in the model assuming intra-periodontal pocket irradiation, and more than 99% in the model assuming extra-periodontal pocket irradiation. In addition, when the effect of aPDT on gene expressions of the bacteria were investigated, decreased expressions were observed in *oxyR* and *sod*, which are oxidative stress response genes, and in *luxS*, which is related to biofilm formation.

研究分野：歯周治療系歯学

キーワード：抗菌光線力学療法 バイオフィーム インドシアニンググリーン 歯周病原細菌 ナノ粒子 歯肉外部照射法

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。

1. 研究開始当初の背景

バイオフィルム感染による難治性疾患は近年、増加傾向にあり、NIH グラントの調査では、感染症の約 60%以上にバイオフィルムが関与しているとしている¹⁾。また、バイオフィルム感染症の原因菌が、薬剤耐性 (AMR: antimicrobial resistance) を示すことも少なくなく、社会的な問題となっている。AMR 細菌の増加については、細菌自体が耐性形質を獲得し多剤耐性化していく一方で、バイオフィルム形成菌など抗菌薬が作用しにくい生息形態をとる細菌が選択的に増加することも、その一因となっており、バイオフィルム感染への対策は世界的に急務な事項といえる。

バイオフィルムは、細菌の固着性社会集団で、細菌自らの産生する菌体外多糖 (EPS: extracellular polysaccharides) に覆われて独自の生態系を構築している。バイオフィルム内の細菌は、静止状態にあり、代謝が低いため、代謝阻害を作用機序とする抗菌薬は効果が乏しい。また、クオラムセンシングに代表されるような細胞間情報伝達機能により、抗菌薬抵抗性などの生物活性を発現する²⁾。さらには、EPS が薬剤の浸透を拒み、浮遊細菌に対して効果のあった抗菌手段がバイオフィルムでは、同様な効果を示すことができない。したがって、バイオフィルム感染症対策においては、効率的に EPS を破壊し、内部で独自応答を示す細菌に対し効果的に作用する殺菌手段が求められている。

抗菌光線力学療法 (aPDT: antimicrobial photodynamic therapy) は、特定波長の光により光感受性物質を励起することで活性酸素 (一重項酸素) を発生させ殺菌を行う治療法である。抗菌薬のような細菌の生物活性を利用した殺菌法とは異なり、直接的に細胞障害を引き起こす殺菌法であるため、バイオフィルム感染症に対する有効な解決策となると考えられている。

我々の研究室では、口腔におけるバイオフィルム感染症である歯周病対策の一環として、aPDT の基礎的研究を行ってきた。新規光感受性物質として、インドシアニングリーン (ICG) をポリ乳酸グリコールのナノ粒子に封入し、キトサンコーティングを施した「キトサン修飾インドシアニンググリーン封入ナノ粒子 (ICG-Nano/c)」を開発し、ICG をプラスに荷電させたことで細菌への付着率が向上し、歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* (P.g.) の浮遊細菌に対し 99% の殺菌効果が認められるようになった³⁾。

歯周病に対する aPDT は、いくつかのシステムがすでに製品化され、臨床応用されているが、それらはいずれも、レーザープローブを歯周ポケット内に挿入し、光感受性物質に直接光を当てて励起を促している (歯周ポケット内照射法)。我々は、ICG-Nano/c の励起に用いる 810nm の半導体レーザーの高い組織透過性に着目し、根分岐部病変など歯周ポケット内からアクセスしにくい部位に対し、歯周ポケット外から光を照射して、その透過光により aPDT を行うという新たな照射法 (歯周ポケット外照射法) も考案し、その方法によっても高い殺菌性を示すことを報告した⁴⁾。

しかし、これまでの我々の基礎研究はいずれも浮遊細菌に対してのみであり、薬剤が浸透しにくいバイオフィルムに対しての検討は行っていない。歯周病バイオフィルムへの対策として、aPDT が抗菌薬に変わりうる治療法となるのか、AMR 対策の一つの選択肢になるのか、それを見極め、今後の臨床応用、製品化を目指す上でも、バイオフィルムに対する殺菌効果のデータを蓄積しておく必要がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、我々が独自に開発を続けてきた ICG-Nano/c と半導体レーザーを用いた aPDT のシステムが、歯周病バイオフィルムに対し十分な殺菌効果を発揮するのかを、検討することにある。これまでに、浮遊細菌に対し、歯周ポケット内照射を想定したモデルと歯周ポケット外照射を想定したモデルで研究を実施しており、本研究においても、歯周病バイオフィルムに対して、両方のモデルで殺菌効果の確認を行う。

また、aPDT が細菌の酸化ストレス応答に対してどのような影響を与えるのか、aPDT によりクオラムセンシングなどバイオフィルム形成に対する遺伝子発現に変化が生じるのかについても、検討を加える。

3. 研究の方法

(1) 使用した細菌株

歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis*、プラーク初期定着である *Streptococcus gordonii* (S.g.) を用いて、それぞれ、単独浮遊細菌、混合浮遊細菌、単独菌種バイオフィルム、混合菌種バイオフィルムの 4 つの状態での殺菌効果を確認した。

(2) レーザー照射条件

歯周ポケット内照射モデルでは、チューブやウェルプレートに対して直接レーザーを照射した。出力 0.7W、duty cycle 50%、エネルギー密度 1.39W/cm²、照射距離 1 cm で 60 秒ごとに 10 秒休止する間欠照射を行なった。歯周ポケット外照射モデルでは出力を 2.0W とし、ウェルプレート上に歯肉モデルとして 3 mm 厚の牛肉片を置いて、その上方からレーザーを照射した。流速 2

L/min でエアブロー冷却を行いながら、duty cycle 50%、エネルギー密度 1.39W/cm²、照射距離 1 cm で 60 秒ごとに 10 秒休止する間欠照射を行なった。

(3) 浮遊細菌に対する殺菌効果の確認

P.g.、S.g.それぞれの単独菌液あるいは2菌種混合菌液(OD値=0.1)を0.2mlチューブに100μl注入し、ICG-Nano/c溶液(100μl)を添加後、レーザー1分照射した。混合溶液を回収、段階希釈して、寒天培地に播種、嫌気培養後にコロニーをカウントした。

(4) バイオフィームに対する殺菌効果の確認

単独菌種バイオフィームでは、それぞれOD値=0.1に培養した菌液100μlを96ウェルプレートのウェルに入れて37°Cで3日間嫌気培養し、培養上清を除去後、ICG-Nano/c溶液を添加してレーザー照射を行なった。照射後の溶液をバイオフィームと懸濁して回収し、混合溶液を回収、段階希釈して、寒天培地に播種、嫌気培養後にコロニーをカウントした。

複合バイオフィームでは、S.g.菌液(OD値=0.01)を100μlを96ウェルプレートのウェルに入れて1日間嫌気培養し、上清を除去した後にP.g.菌液(OD値=0.4)100μlを入れ、さらに2日間培養した。その後は単独細菌と同様にレーザー照射およびコロニーカウントを実施した。

5) 酸化ストレス応答、バイオフィーム関連遺伝子発現に対する影響

1.5mlチューブにてP.g.の単独菌液500μlにICG-Nano/c溶液500μlを加え、出力0.7Wで30秒間レーザー照射を行なった。菌体を回収し、RNAを抽出し、リアルタイムPCRにて、酸化ストレス応答、バイオフィーム関連遺伝子の発現を調べた。

4. 研究成果

(1) 浮遊細菌に対する殺菌効果

P.g.単独の浮遊細菌においては、コロニー数で 10^{-2} ~ 10^{-3} の減少が認められた。すなわち成菌数がコントロールの1%以下となる殺菌効果が認められた。一方、S.g.では数%まで減少はするものの、1%以下とはならなかった。この傾向は、2菌種混合の浮遊細菌においても、同様の結果であった。これは、P.g.が偏性嫌気性菌であるのに対し、S.g.が通性嫌気性菌であるため、酸化ストレスに対して抵抗を示している可能性がある。

(2) ポケット内照射モデルにおけるバイオフィームに対する殺菌効果

バイオフィームに直接的にレーザーを照射するポケット内照射モデルにおいて、P.g.単独のバイオフィームでは、 10^{-1} 以下となる殺菌効果が認められた。S.g.単独バイオフィームにおいても同様の結果であった。また、照射時間を変えて同様の実験を行ったところ、時間依存的に殺菌効果が高まった。

2菌種混合のバイオフィームにおいては、それぞれの菌種で有意な減少が認められた。また、時間依存的に殺菌効果が高まることが確認された。5分の照射において、両菌種ともコントロールの3%以下となる殺菌効果が認められた。

(3) ポケット外照射モデルにおけるバイオフィームに対する殺菌効果

バイオフィームに直接レーザーを当てるのではなく、バイオフィーム上に3mm厚の牛肉片を設置して、その外部からレーザーを照射するポケット外照射モデルにおいては、P.g.単独バイオフィームで 10^{-3} 以下となる殺菌効果が認められた。S.g.単独バイオフィームでは、 10^{-2} 程度となる殺菌効果があった。これらの効果は、ポケット内照射モデルでの殺菌効果よりも高く、その理由として、歯肉モデルによるエネルギーの減弱を補うため、出力を高めてレーザーを照射していることで、実際にバイオフィームに届くエネルギーが高くなっている可能性が考えられる。以前の研究において、透過したレーザー光のエネルギーが直接照射のエネルギーと同等となるように設定したが、使用する個々の肉質の違いにより、透過エネルギーが高くなっている可能性がある。混合バイオフィームにおいても、高い殺菌効果がえられた。また、殺菌効果は時間依存的に高くなった。単独バイオフィームと同様に、S.g.よりもP.g.に対して高い殺菌効果が認められた。

(4) aPDTによるP.g.遺伝子発現への影響

aPDT下でのP.g.における遺伝子発現を調べたところ、酸化ストレス応答遺伝子であるoxyR、sod、バイオフィーム形成に関連するluxSで発現の低下が認められた。この減少が、aPDTで発生される一重項酸素による刺激に直接的に反応したものなのか、細胞破壊に向かう過程で、全般的な発現が低下したことによるものなのかは不明で更なる詳細な検討が求められる。

以上の結果より、我々のaPDTシステムは、バイオフィームに対しても高い殺菌効果を示すことが確認された。しかし、実際にどの程度の殺菌効果があれば臨床的に意味のあるものなのかは不明である。また、他の化学的ブラークコントロールの方法との比較は行っていないので、従来の方法に変わるものであるかも不明である。しかし、AMR対策や観血的処置が困難な場合の処置として、臨床的なオプションになりうる可能性は示された。

今後、さらにバイオフィームへの殺菌効率を高めるための改良を続けていき、臨床結果の向上に繋げていく予定である。

- 1) Lewis K. Antimicrob Agents Chemother 45: 999, 2001
- 2) Marsh PD. Periodontol 2000 55:16, 2011
- 3) Nagahara A. J Periodont Res 48: 591. 2013
- 4) Sasaki Y. Int J Mol Sci 18: 154. 2017

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hayashi Jun ichiro, Ono Kohta, Iwamura Yuki, Sasaki Yasuyuki, Ohno Tasuku, Goto Ryoma, Nishida Eisaku, Yamamoto Genta, Kikuchi Takeshi, Higuchi Naoya, Mitani Akio, Fukuda Mitsuo	4. 巻 -
2. 論文標題 Suppression of subgingival bacteria by antimicrobial photodynamic therapy using transgingival irradiation: A randomized clinical trial	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Periodontology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/JPER.23-0328	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 Takeshi Kikuchi, Jun-Ichiro Hayashi, Akio Mitani	4. 巻 12
2. 論文標題 Next-Generation Examination, Diagnosis, and Personalized Medicine in Periodontal Disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Personalized Medicine	6. 最初と最後の頁 1743
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jpm12101743	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 Naoya Higuchi, Jun-ichiro Hayashi, Masanori Fujita, Yuki Iwamura, Yasuyuki Sasaki, Ryoma Goto, Tasuku Ohno, Eisaku Nishida, Genta Yamamoto, Takeshi Kikuchi, Akio Mitani and Mitsuo Fukuda	4. 巻 22
2. 論文標題 Photodynamic Inactivation of an Endodontic Bacteria Using Diode Laser and Indocyanine Green-Loaded Nanosphere	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8384
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22168384	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5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小野皓大, 林潤一郎, 岩村侑樹, 樋口直也, 西田英作, 菊池 毅, 三谷章雄, 福田光男
2. 発表標題 インドシアニングリーン封入ナノ粒子と半導体レーザーを用いた抗菌光線力学療法の歯周病バイオフィルムに対する殺菌効果
3. 学会等名 第35回日本レーザー歯学会総会・学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小野皓大、岩村侑樹、樋口直也、大野祐、西田英作、菊池毅、三谷章雄、林潤一郎
2. 発表標題 バイオフィルムに対するインドシアニングリーン封入ナノ粒子と 半導体レーザーによる抗菌光線力学療法の殺菌効果
3. 学会等名 日本歯科保存学会2024年度春季学術大会（第160回）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 林潤一郎
2. 発表標題 歯肉外部照射法を用いた新規抗菌光線力学療法の開発
3. 学会等名 第43回日本レーザー医学会総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林潤一郎、小野皓大、岩村侑樹、樋口直也、西田英作、菊池毅、三谷章雄、福田光男
2. 発表標題 歯周ポケット外からの近赤外線レーザー照射を用いたaPDTはポケット内細菌を抑制する
3. 学会等名 第34回日本レーザー歯学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 樋口直也、佐々木康行、藤田将典、林潤一郎、三谷章雄、福田光男、中田和彦
2. 発表標題 インドシアニンググリーン封入ナノ粒子と半導体レーザーを用いた抗菌光線力学療法のEnterococcus faecalisバイオフィルムへの殺菌効果（第2報）
3. 学会等名 第153回日本歯科保存学会2020年度秋季学術大会
4. 発表年 2020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	福田 光男 (Fukuda Mitsuo) (40156790)	愛知学院大学・歯学部・歯学部研究員 (33902)	
研究 分担者	長谷川 義明 (Hasegawa Yoshiaki) (70460524)	愛知学院大学・歯学部・教授 (33902)	

	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 協力者	小野 皓大 (Ono Kota)		

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