

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K19076

研究課題名(和文)EBMに基づく光線力学療法の歯科医療への挑戦

研究課題名(英文)Challenging for dental care of photodynamic therapy on EBM

研究代表者

小峯 千明(KOMINE, Chiaki)

日本大学・松戸歯学部・講師

研究者番号：60708577

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：歯科医療において光線力学(光エネルギー)の応用は未だ発展途上にあるのが現状である。実際の臨床現場で応用するためにはさらに多くの科学的根拠に基づいた知見が必要である。そこで本補助事業期間では臨床現場でしばしば見受けられる状況を想定し、報告を行った。まず、光と光増感剤を用いて細菌を殺菌するといった抗菌的光線力学療法メカニズムについて報告した。次に、根管治療の際に生じる根管内スメア(歯の削りカス)の除去に関して生体に安全な低濃度過酸化水素および光を用いた除去方法の報告、最後に個人診療所において光を用いることで容易に口腔がん早期発見を検出可能とした新規方法について提案をした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

可視光領域を主体とした光は、生体に対して安全でありむしろ生体の賦活化を導くものとして整形外科をはじめとした医科領域などでは特に使用されている。一方、歯科領域では直視できる組織という環境から外科的・化学的に処置を行うことを主流としてきた。しかしながら、それらの処置は侵襲を伴うものも多くあることから、光が有する効果的な作用でそれを置換する方法が導き出せれば有意義な事であると考えている。特に本補助事業内で報告した口腔がんの早期発見方法においては個人歯科医院においても疑わしい病変部を客観的に即時数値化できる可能性を秘めていることから大きく貢献できるものと考えている。

研究成果の概要(英文)：The application of photodynamics (light energy) in dentistry is still in its developmental stages. In order to apply it in actual clinical practice, more knowledge based on scientific evidence is needed. Therefore, in this grant project, we reported on a situation that is often seen in clinical practice. First, we reported on the mechanism of antibacterial photodynamic therapy, in which light and photosensitizers are used to kill bacteria. Next, we reported on a removal method using low-concentration hydrogen peroxide and light, which is safe for living organisms, for removing intracanal smears generated during root canal treatment, and finally, we proposed a new method that enables easy detection of early oral cancer by using light in private clinics.

研究分野：歯科保存学, 歯科臨床検査医学

キーワード：光線力学療法 活性酸素種 歯内療法・根管治療 口腔がん早期発見 抗菌的光線力学療法 光線力学診断

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 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

光線力学療法は医科領域でがん治療に用いられてきた。また近年、歯科領域においても微生物を殺菌する目的に抗菌的光線力学療法(antimicrobial PDT, a-PDT)として認知されるようになり、研究報告も数多くされてきている。しかしながら、それらの報告では光源、光感受性物質またはどのような微生物を殺菌できたかなどの a-PDT の有効性を報告するにとどまり、根拠となる殺菌メカニズムに関してはほとんど報告がなされていない状況であった。殺菌メカニズムは活性酸素種(ROS)が関与していることが分かっており、本補助事業ではその ROS を電子的スピントラッピング(ESR)法により補足しすることで光線力学および光触媒反応などの様々な殺菌メカニズムを報告する。また、歯科医療において光を用いた歯科治療の有効性・早期口腔がんの客観的かつ簡易的検出法を考案したいと考えていた。

2. 研究の目的

- (1) 光化学反応から発生する様々な ROS と殺菌メカニズムを明らかにすること
- (2) 光化学反応から発生する ROS, とくにヒドロキシラジカル($\cdot\text{OH}$)に着目し根管治療時に発生するスメア層の除去効果を明らかにすること
- (3) 口腔がん早期発見法として腫瘍細胞内に生じる特有のポルフィリン代謝に着目し、アミノレブリン酸(5-ALA)を作用させることで生じるプロトポルフィリンIX(PpIX)を励起させることで客観的に口腔粘膜疾患の評価を行うこと(光線力学診断, PDD)

以上、3つの項目を目的に研究を行った。

3. 研究の方法

- (1) 光化学反応から発生する様々な ROS と殺菌メカニズムを明らかにする

口腔内に存在するグラム陽性菌(*Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*)および陰性菌(*Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*)に対して生理食塩水に混和した酸化チタン(、rutile型)に405 nm LEDを照射(1, 2 および 3 分)することで発生する ROS を捕捉し、それぞれの細菌に対する殺菌効果と ROS 発生量との関係を比較し、殺菌メカニズムを考察した。

メチレンブルーを用いた a-PDT における *Candida albicans* に対する殺菌メカニズムはすでに ROS の一種である一重項酸素($^1\text{O}_2$)による細胞壁への物理的障害によるものと報告したが、さらに信憑性を高めるために $^1\text{O}_2$ 消去剤としてアジ化ナトリウム(NaN_3 , 10 mM)を作用させることで *C. albicans* の殺菌効果の変化から a-PDT の殺菌メカニズムについて考察した。

(2) 1 M 過酸化水素水に対して可視光線 405 nm LED (8.69 mW/cm²) を 10, 20 および 30 秒照射することで得られる $\cdot\text{OH}$ 量を ESR 法において測定した。また Izawa らの方法に従い、抜去歯を調整した後、1 M 過酸化水素水内で照射させることでスメア層の除去効果を検討した。

(3) OSCC 由来細胞株(HSC-2, HSC-3, HSC-4, Sa3)および正常ヒト口腔ケラチノサイト(HOK)に対して 5-ALA を使用した PDD を蛍光プレートリーダーで測定し、細胞株の違いや細胞数の違いによる経時的な蛍光強度の挙動を測定した。さらに蛍光強度を効率よく得るために 5-ALA 代謝経路の中の PpIX からへムに変換される際に必要な Ferrochelatase 活性を阻害する Diferoxamine (DFO)を併用する PDD を行い、得られる蛍光強度を検討した。

また、個人歯科医院でも上記 PDD 法を行えるようにポータブル蛍光分光光度計を使用した方法についても検討した。

4. 研究成果

- (1) 光化学反応から発生する様々な ROS と殺菌メカニズムを明らかにした。

TiO₂(4 mg/ml)に対して 405 nm LED を照射した結果、ESR 法により $^1\text{O}_2$ を検出した(図 1)。

つまり 1, 2 及び 3 分間の照射で発生した $^1\text{O}_2$ 量は、それぞれ 5.5, 11.7 および 14.9 μmol であり照射時間依存的に増加した。また同時に陰性菌の殺菌効果も $^1\text{O}_2$ 発生量的に増加した。一方、グラム陽性菌では 3 分間の照射ではほとんど殺菌効果は示さなかった(図 2)。基本的には $^1\text{O}_2$ による細胞膜障害で殺菌に至らずものと考えられるが、両者の違いは細菌構成であると推測した。つ

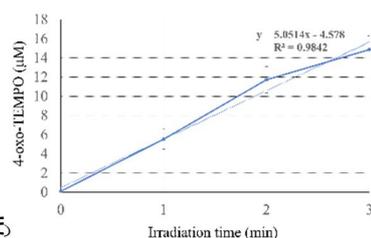


図 1. TiO₂に対して405 nm LEDを照射した際に生じた $^1\text{O}_2$

り、グラム陽性菌は陰性菌と比較し厚い細胞壁を有しており細菌本体への傷害は与えられないため殺菌できず、グラム陰性菌では細胞壁が薄いため細菌本体が傷害受け殺菌に至ったものと考えた(図2)。またグラム陰性菌の中でも *P. gingivalis* はポルフィリンを菌体内で代謝されることから菌体内 PpIX に対して励起光である 405 nm LED が菌体内で反応し ROS を生じさせた結果、最も殺菌効果を得たものと示唆した(図3)¹⁾。

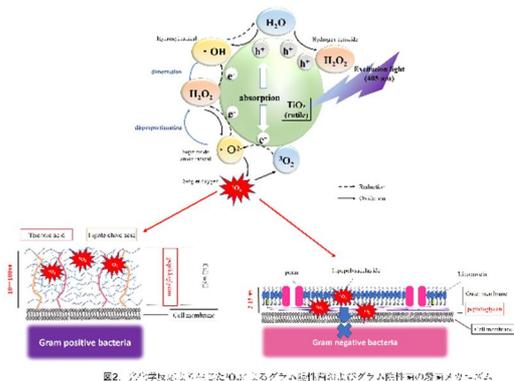


図2. 光触媒反応によるTiO₂によるグラム陽性菌およびグラム陰性菌の殺菌メカニズム

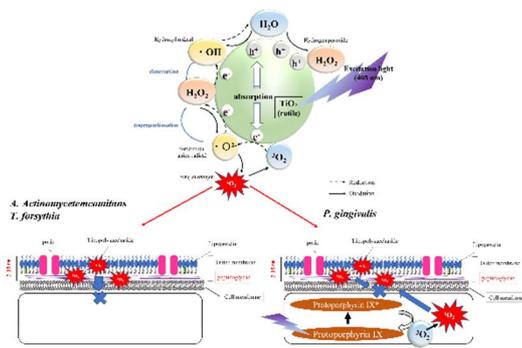


図3. PpIXと励起光によって生じる*P. gingivalis*の殺菌メカニズム

C. albicans に対して各濃度 NaN_3 を 30 分間作用させた際の 48 時間後の細菌生存率を検討した結果、10 mM NaN_3 では細菌生存率に影響を及ぼさないことを示した(図4)。また 10mM NaN_3 がメチレンブルーに励起光(660 nm)を照射した際に生じる $^1\text{O}_2$ を特異的に消去することを示した(図5)。以上の結果に基づいて、各群を設定し *C. albicans* の殺菌試験を行ったところ、 $^1\text{O}_2$ を特異的に消去した群(a-PDT with NaN_3 群)ではメチレンブルーのみを作用させた群(Control 群)と比較し、顕著な殺菌効果を示さなかった(図6)。以上のことから a-PDT による殺菌メカニズムは $^1\text{O}_2$ によるものと示唆した²⁾。

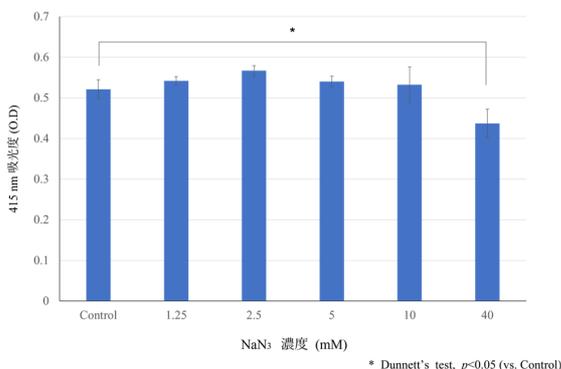


図4. 各濃度 NaN_3 を 30 分間作用させた際の *C. albicans* 生存率

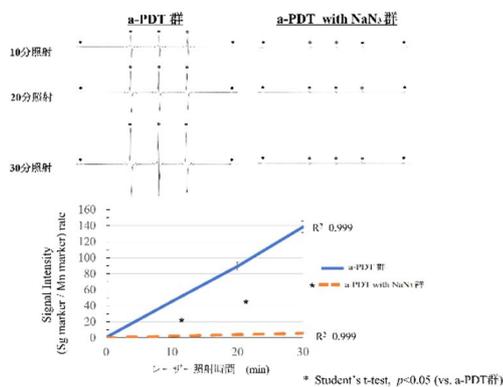


図5. NaN_3 (10 mM) における $^1\text{O}_2$ 発生量について

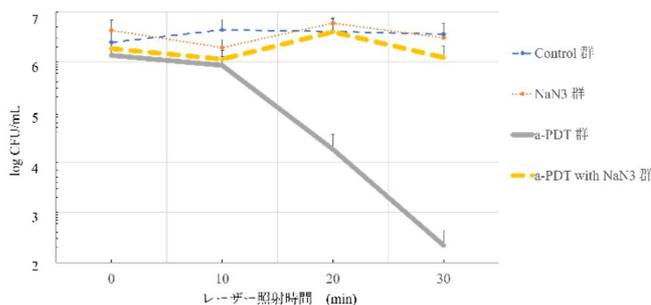


図6. 各群の *C. albicans* 殺菌効果について

(2) 1 M 過酸化水素に対して無照射 (H_2O_2 群) と可視光線 405 nm LED を 1 M 過酸化水素に対して 10, 20 および 30 秒間照射した ($\cdot\text{OH}$ 群) 際に発生した ROS 比較を示す(図7)。

$\cdot\text{OH}$ 発生量は $\cdot\text{OH}$ 群において H_2O_2 群と比較し、照射時間依存的に有意に増加した ($y=30.114x-30.376, R^2=0.99$)。この結果を利用し LED を 3 分間、過酸化水素に照射した際の $\cdot\text{OH}$ 発生量と根管形成されたスメア層除去の関係について SEM を用いた評価を行った。その結果、生理食塩水に浸漬させた control 群と比較し、 H_2O_2 群では、ややスメア層に亀裂を認めたものの除去に至る所見は認めなかった。一方、 $\cdot\text{OH}$ 群ではスメア層が鱗状に剥離し象牙細管の露出を認

めた。これが示唆することは、過酸化水素自体も ROS に分類されるため少なからずその酸化力によりスメア層に亀裂を生じさせたことが推察できるものの、 $\cdot\text{OH}$ の発生がスメア層の除去に大きく関与していると言える(図8)。現状、根管内スメア層除去にはエチレンジアミン4酢酸(EDTA)が主に使用されといる。結果として、欠点としてカルシウムイオンのキレート作用から根管内において穿孔部などからの出血を認めた場合、凝固阻害による止血困難な場合が考えられるためスメア層除去に対する新しい根管洗浄法として期待できる³⁾。

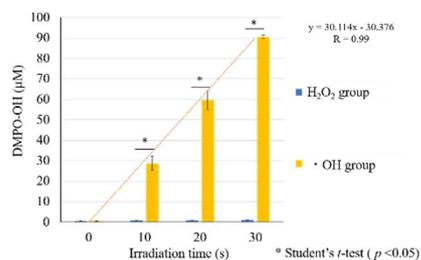


図7. 過酸化水素から得たヒドロキシラジカル発生量

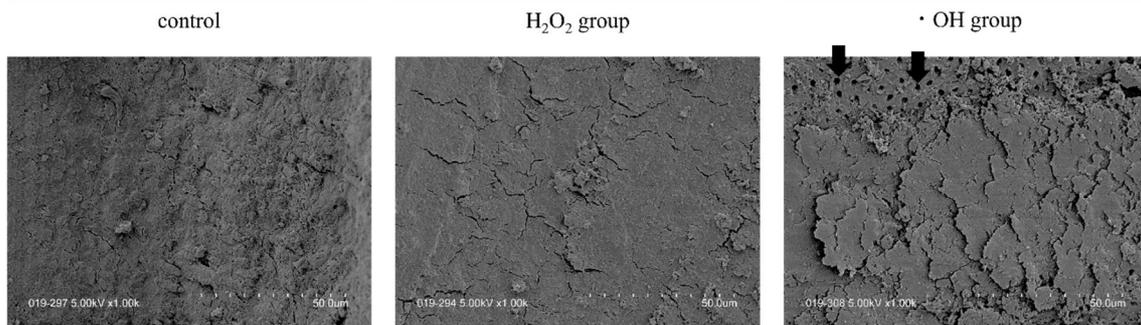


図8. $\cdot\text{OH}$ によるスメア層に対する作用をSEMで評価

(3) 口腔がん早期発見のため 5-ALA と蛍光プレートリーダーから得た蛍光強度を利用した PDD に関する基礎的知見を得た。すなわち正常口腔粘膜細胞(HOK)と培養ヒト口腔扁平上皮癌(OSCC)由来細胞株(HSC-2, HSC-3, HSC-4, Sa3)を用いて 5-ALA による代謝産物 PpIX に対して励起光 405 nm を照射し、蛍光波長 630 nm の蛍光強度の挙動相違により客観的なスクリーニングが可能か否かを行った。まず初めに細胞株の違いや細胞数の違いによる経時的な蛍光強度の挙動を測定した結果、細胞数の違いによる 5-ALA を作用させた(+群) / 5-ALA 作用させない(-群)の蛍光強度比は、代謝時間 240 分において $>10^5 > 10^4$ cells の順に細胞数依存的に増加した。 10^4 と 10^5 cells における蛍光強度比は、5-ALA の有無にかかわらず蛍光強度に有意な差は認めなかった(図9)。そのため、有意差を示した 10^6 cells に焦点を絞り、細胞株の違いによる蛍光強度の挙動変化について検討した。各細胞株間の蛍光強度の挙動は、5-ALA (+)群において HSC-2, HSC-3 および HSC-4 では作用 40 分後、Sa3 では作用 60 分後、さらに HOK では作用 100 分後にそれぞれの 5-ALA (-)群の蛍光強度との間に有意な増加があり、かつ OSCC 細胞株間での増強レベルは HSC-2 > HSC-4 > HSC-3 > Sa3 の順となった(図10)。

この蛍光強度の差については OSCC 細胞株の分化度や採取部位などによるものと推察されるが、いずれの OSCC 細胞株においても代謝 40 分後に HOK の蛍光強度と比較し、有意な増加を示したことから PDD は口腔がんの早期発見に使用可能で

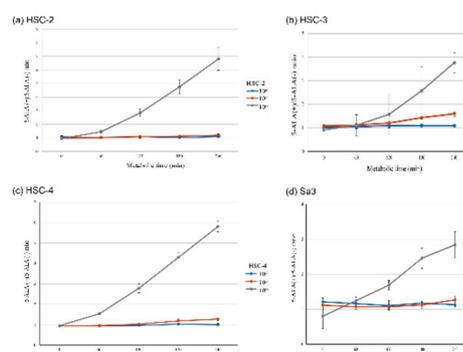


図9. 細胞数の違いによる各OSCC細胞株間での蛍光強度の挙動

この蛍光強度の差については OSCC 細胞株の分化度や採取部位などによるものと推察されるが、いずれの OSCC 細胞株においても代謝 40 分後に HOK の蛍光強度と比較し、有意な増加を示したことから PDD は口腔がんの早期発見に使用可能で

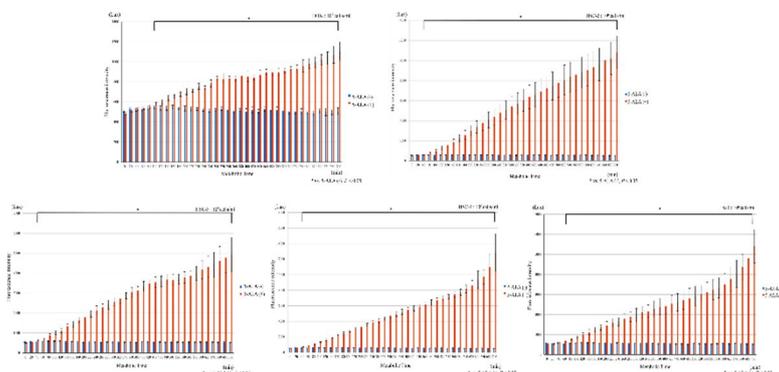


図10. 10^6 cellsによるHOKならびに各OSCC細胞株間での蛍光強度の挙動

あることが示唆された。しかしながら、蛍光強度の有意な増加を示した細胞数は 10^6 cells 必要であったことから実際に口腔内から擦過することは困難であることからより少ない細胞数で PDD を行う必要があった。より少ない細胞数で有意な蛍光強度差を検知することを目的とした。つまり、少ない細胞数で細胞内 PpIX 蓄積を誘導させるため、5-ALA 代謝経路の中の PpIX からヘムに変換される際に必要な Ferrochelatase 活性を阻害する DFO を併用する PDD を行い、得られる蛍光強度を検討した。その結果、5-ALA に DFO を添加することで HOK と OSCC 細胞株間の各細胞数を比較したところ、すべての OSCC 細胞株 5×10^5 cells において、蛍光強度は代謝 120 分後に HOK の蛍光強度より有意に増加した (図 11)。

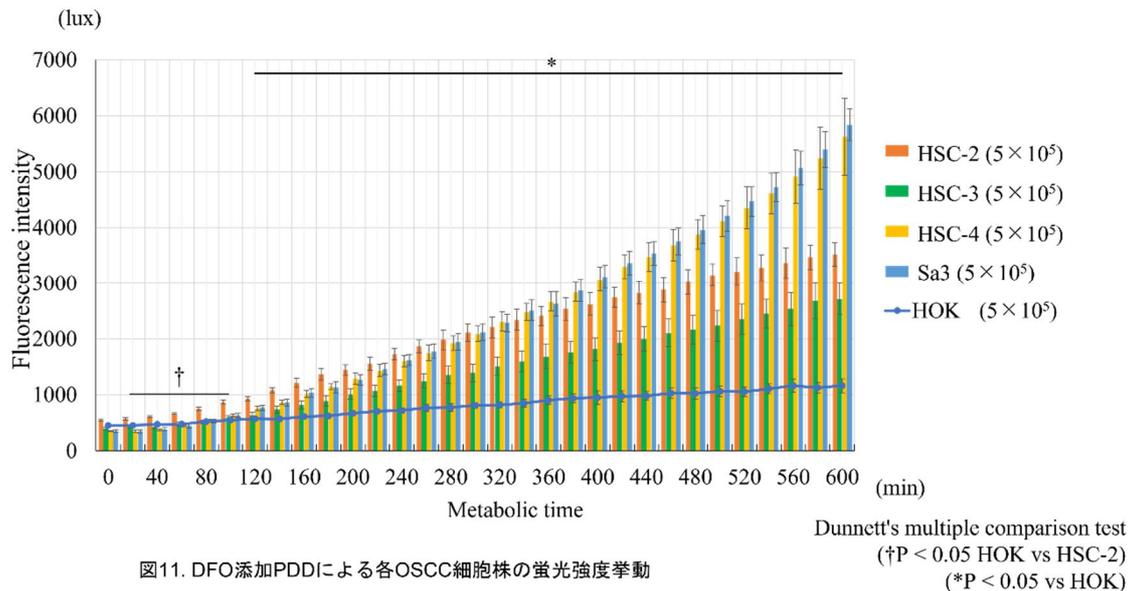


図11. DFO添加PDDによる各OSCC細胞株の蛍光強度挙動

このことは DFO を添加することで 5-ALA 単独と比較し、半数の細胞数で PDD が可能であることを示唆した。以上の結果から、口腔がん早期発見に対する PDD の基礎的知見は、OSCC 細胞株に対してその蛍光強度の違いから数時間でかつ客観的に評価することが可能であり、チェアサイドにおける蛍光プレートリーダーを用いたスクリーニングおよび診断基準の策定の一助となると考えられた^{4,5)}。

<引用文献>

- 1) Chiaki Komine, Chitaka Takahashi, Hiroko Omori, Yuki Ogura, Yoshimi Konishi, Hidenori Suzuki, Otsuka Issei, Mana Fuchigami, Osamu Tsuzukibashi, Akira Fukatsu, Yasuhisa Tsujimoto, Masahiko Fukumoto, Bactericidal Effect of Antimicrobial Photodynamic Therapy Using Visible Light-responsive Titanium Dioxide -the First Report-, Int J Oral-Med Sci, 18 (3&4): 155-163,2020.
- 2) 小峯 千明, 小西 賀美, 小倉 由希, 大森 寛子, 鈴木 秀紀, 中島 麻友, 伊澤 万貴子, 淵上 真奈, 続橋 治, 深津 晶, 若見 昌信, 内田 貴之, 村上 洋, 福本 雅彦, 一重項酸素発生抑制時における抗菌的光線力学療法の殺菌効果, 日大口腔科学 45(4) : 164-172, 2019.
- 3) Chiaki Komine, Yoshimi Konishi, Masahiro Ishii, Masato Izawa, Yasuhisa Tsujimoto, The smear layer removal effect of hydroxyl radicals generated from hydrogen peroxide irradiated with 405-nm LED light, Int J Microdent ,12, 78-84, 2021.
- 4) Hiroko Omori, Chiaki Komine, Development of a Photodynamic Diagnosis Method for Oral Squamous Cell Carcinoma Using 5-Aminolevulinic Acid and a Luminescence Plate Reader, Open Journal of Stomatology Vol.11 No.9 , September 7, 2021
- 5) Chiaki Komine, Hiroko Omori, Yuki Ogura, Yoshimi Konishi-Takahashi, Katsuhiko Asaka, Yoshinori Ono, Mana Fuchigami, Osamu Tsuzukibashi, Akira Fukatsu, Masahiko Fukumoto, Establishment of the method for objective screening of oral malignant tumors using photodynamic technique by a fluorescence plate reader, JJ S E D P, 14 (1), 17-26 , 2022

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Asaka Katsuhiko, Fukatsu Akira, Komine Chiaki	4. 巻 12
2. 論文標題 The Effectiveness of a Portable Fluorescence Spectrophotometer for Early Detection of Oral Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Open Journal of Stomatology	6. 最初と最後の頁 30～31
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4236/ojst.2022.121003	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 Chiaki Komine, Masahiko Fukumoto, Hiroko Omori, Yuki Ogura, Yoshimi Konishi-Takahashi, Katsuhiko Asaka, Yoshinori Ono, Mana Fuchigami, Osamu Tsuzukibashi, Akira Fukatsu	4. 巻 14
2. 論文標題 Establishment of an objective screening method for oral malignant tumors using a photodynamic technique involving a fluorescence plate reader	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本口腔検査学会雑誌	6. 最初と最後の頁 17～26
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15041/jsedp.14.17	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 Omori Hiroko, Komine Chiaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Development of a Photodynamic Diagnosis Method for Oral Squamous Cell Carcinoma Using 5-Aminolevulinic Acid and a Luminescence Plate Reader	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Open Journal of Stomatology	6. 最初と最後の頁 325～340
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4236/ojst.2021.119029	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 Chiaki Komine, Masato Izawa, Tomoko Izawa (Kimura), Ken Wada, Masahiro Ishii, Hirotaka Nakazawa, Hidenori Yamaguchi, Yoshihiro Sugawara, Yasuhisa Tsujimoto	4. 巻 11
2. 論文標題 Investigation of the simulated root canal cutting limit of nickel-titanium rotary files with repeated phase-transformation heat treatment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Microdent	6. 最初と最後の頁 118-124
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Takashi Uchida, Chiaki Komine, Takashi Iida, Masakazu Okubo, Osamu Komiyama	4. 巻 10
2. 論文標題 Simultaneous Occurrence of Myofascial Pain Referred to Tooth and Endodontic Lesions in Patient with Toothache: A Case Report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Open Journal of Stomatology	6. 最初と最後の頁 230-240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4236/ojst.2020.108022.	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 中西一、小西賀美、小峯千明	4. 巻 13(1)
2. 論文標題 過酸化水素と405 nm LED 照射から発生した ヒドロキシラジカルによる <i>Candida albicans</i> の殺菌効果	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本口腔検査学会誌	6. 最初と最後の頁 14-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 岡部 達, 小関 亮介, 船木 弘, 神尾 直人, 小峯 千明, 松島 潔	4. 巻 45(1)
2. 論文標題 根管洗浄における超音波照射にナノバブル水を応用した抗菌効果	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日大口腔科学	6. 最初と最後の頁 52-58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Makiko Kageyama, Issei Otsuka, Chiaki Komine	4. 巻 29(3)
2. 論文標題 Clarification of the sterilization mechanism of antimicrobial photodynamic therapy for <i>Candida albicans</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Japanese society for laser dentistry	6. 最初と最後の頁 141-147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 小峯千明, 浅賀勝寛, 大森寛子, 小西賀美, 淵上真奈, 続橋 治, 深津 晶, 福本雅彦, 辻本恭久	4. 巻 14(1)
2. 論文標題 う蝕予防における抗酸化加工食品ならびにポリフェノールの効果	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ジャパンオーラルヘルス学会誌	6. 最初と最後の頁 15-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Chiaki Komine, Chitaka Takahashi, Hiroko Omori, Yuki Ogura, Yoshimi Konishi, Hidenori Suzuki, Otsuka Issei, Mana Fuchigami, Osamu Tsuzukibashi, Akira Fukatsu, Yasuhisa Tsujimoto, Masahiko Fukumoto	4. 巻 18 (3&4)
2. 論文標題 "Bactericidal Effect of Antimicrobial Photodynamic Therapy Using Visible Light-responsive Titanium Dioxide -the First Report-"	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Oral-Medical Sciences	6. 最初と最後の頁 155-163
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 小峯 千明, 小西 賀美, 小倉 由希, 大森 寛子, 鈴木 秀紀, 中島 麻友, 伊澤 万貴子, 淵上 真奈, 続橋 治, 深津 晶, 若見 昌信, 内田 貴之, 村上 洋, 福本 雅彦	4. 巻 45(4)
2. 論文標題 一重項酸素発生抑制時における抗菌的光線力学療法の殺菌効果	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日大口腔科学	6. 最初と最後の頁 164-172
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 大森寛子、小峯千明ほか
2. 発表標題 可視光線を励起波長とした酸化チタン光触媒作用における口腔内微生物の殺菌効果
3. 学会等名 第12回日本口腔検査学会総会・学術大会
4. 発表年 2019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
---------	---------