

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791932

研究課題名（和文）

光線力学療法を高度利用した活性酸素殺菌法の開発

研究課題名（英文）

Development of a novel disinfection technique based on photodynamic therapy

研究代表者

中村 圭祐（NAKAMURA KEISUKE）

東北大学・未来科学技術共同研究センター・助教

研究者番号：30431589

研究成果の概要（和文）：

光線力学療法を応用した殺菌技術により非常に効果的に黄色ブドウ球菌を殺菌できることを実証した。さらに光線力学療法において生成される一重項酸素の定量法を確立し、一重項酸素生成量と殺菌作用の強さの相関性を検証した。一重項酸素測定には環状アミンを用いた電子スピン共鳴法の応用が適していることを実証し、光照射時間や光感受性物質の濃度に依存して一重項酸素が生成されることを示した。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, it was demonstrated that singlet oxygen generated in photodynamic therapy could effectively kill *Streptococcus aureus*. In addition, a quantitative analytical method for singlet oxygen generated in photodynamic therapy has been established. It was demonstrated that electron spin resonance technique using sterically hindered amine was suitable for the measurement. The analysis showed that the yield of singlet oxygen increased with the irradiation time and the concentration of photosensitizer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：光線力学療法、一重項酸素、活性酸素、殺菌

1. 研究開始当初の背景

光線力学療法とは、主に癌治療に利用されている治療法であり、腫瘍細胞に取り込まれた光感受性物質に対してレーザー照射を行い、活性酸素を生成することで腫瘍細胞を破壊するものである。この光線力学療法において、光感受性物質として最も一般的に用いられるのがヘマトポルフィリン誘導体であり、腫瘍細胞に対する集積性が高く、腫瘍選択性

の高い治療法として注目されている。ヘマトポルフィリンはレーザー光を照射されることで活性状態となり、周囲に存在する基底状態の酸素（三重項酸素）を励起状態の酸素、つまり一重項酸素へと変化させる。この一重項酸素は活性酸素の一種であり、非常に反応性が高く腫瘍細胞を酸化することにより破壊する。さらに、ヘマトポルフィリン自体の毒性が低いので静脈内投与あるいは経口投

与が可能であり、深刻な副作用が問題となることはまれである。従って、ヘマトポルフィリンのような光感受性物質を口腔内で用いて、腫瘍細胞をも破壊することができる一重項酸素で殺菌を行うことは十分可能であると考えられる。

口腔内疾患の多くはカリエスや歯周病に代表されるように、歯の表面に形成された細菌性プラークが原因となって引き起こされるので、プラークを除去することが歯科治療の主目的である。現在の歯科治療においては、ブラシやスクレーパーなどを用いた機械的なプラーク除去方法と、薬剤などを用いた化学的なプラーク除去方法が行われている。しかし、両者ともに以下に示すような欠点を有している。

(1) 機械的方法では、器具が到達しない細部に浸潤した細菌を殺菌することが困難であり、さらに治療に際して、しばしば脂質の実質欠損を伴うこととなる。

(2) 化学的方法では、薬理効果が得られるまで局所に薬剤をとどめておくことが困難であり、薬剤の濃度を上げた場合には副作用を併発する。

光線力学療法を応用した殺菌法は、光感受性物質にレーザー照射を行った局所でのみ、殺菌力が高い一重項酸素を生成することで、こういった従来の治療法の欠点を改善することできると考えられる。また、癌治療で求められる光感受性物質の腫瘍細胞に対する集積性は必須条件ではなくなるため、ヘマトポルフィリン以外の光感受性物質を歯科応用できる可能性があり、新しい歯科殺菌療法として期待される。

2. 研究の目的

本研究では、光線力学療法の応用により一重項酸素を発生させ、病原性細菌の殺菌を行うという新しい活性酸素殺菌法を開発することを目的とした。具体的には、(1) 種々の光感受性物質を用いて殺菌試験を行い、光感受性物質の種類による殺菌効果比較検討、および(2) 光線力学療法において生成される一重項酸素の生成量の定量分析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 種々の光感受性物質を用いた殺菌試験
殺菌試験では、3種類の光感受性物質を用いた；①タラポルフィンナトリウム

(Laserphyrin®, 明治製菓)、②エリスロシン(和光純薬)、③トルイジンブルー0 (Waldeck GmbH&Co. KG)。タラポルフィンナトリウムは癌治療を目的とした光線力学療法で用いられるヘマトポルフィリンと類似した組成の薬剤である。また、エリスロシンは歯科分野で歯垢染め出し液の成分として利用されて

いる色素であり、さらにトルイジンブルー0は口腔内がん診断などに用いられている色素である。従って、いずれの試薬に関しても口腔内における光線力学殺菌療法のための光感受性物質として応用できる可能性があるため、本実験での対象試薬として選択した。これらの光感受性物質の吸光スペクトルを分光光度計 (U-2010 Spectrophotometer, HITACH) で測定し、励起波長を確認した。

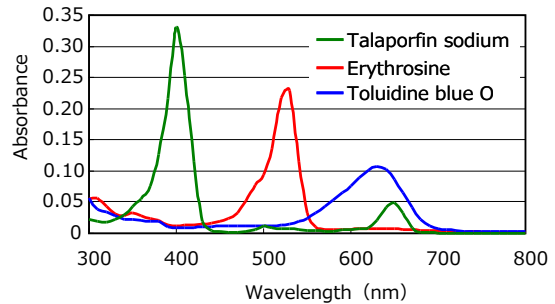


図1. 光感受性物質の吸光スペクトル

図1に示す吸光スペクトル測定の結果より、各光感受性物質の励起波長をタラポルフィンナトリウム: 405 nm、エリスロシン: 530 nm、トルイジンブルー0: 670 nmと決定した。

市販のLEDを用いて実験用光照射装置を作成し、室内光を遮光した状態で光感受性物質に対する光照射を行った。LED基盤は着脱式とし、それぞれの光感受性物質の励起波長に対応したLED基盤を実験に用いた。

殺菌試験には *Streptococcus aureus* ATCC 259232(黄色ブドウ球菌)を用いた。Soybean-casein digest (SCD) 寒天培地で培養し、発育したコロニーを滅菌生理食塩水中に懸濁して実験に用いた。図2に示す研究デザインに従って各光感受性物質(最終濃度: 10, 100 μM)と細菌懸濁液を混和し各処理を行った。

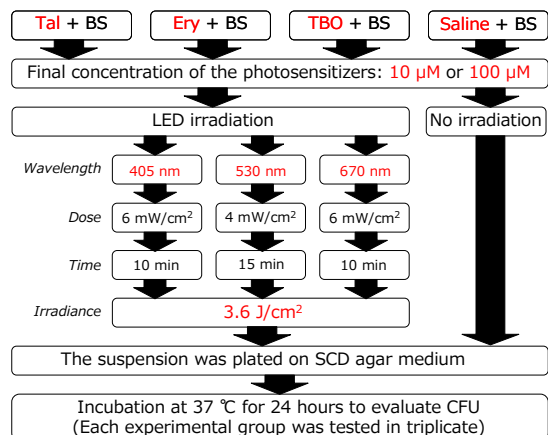


図2. 殺菌試験の研究デザイン (Tal: タラポルフィンナトリウム、Ery: エリスロシン、TBO: トルイジンブルー0、Saline: 生理食塩水、BS: 細菌懸濁液)

処理後に、各試料の 10 倍希釈系列を滅菌生理食塩水を用いて作成し、SCD 寒天培地に播種し 37°C で 24 時間培養を行い残存細菌数の評価を行った。細菌数は、コロニー・フォーミング・ユニット (CFU) /ml として算出した。

(2) 一重項酸素定量分析法の比較検討
光線力学殺菌療法において殺菌作用の主体を担う一重項酸素の定量分析は非常に重要であるが、これまでのところ一重項酸素の定量分析法は確立されていなかった。そこで、本研究では、異なる 3 つの一重項酸素測定法を比較し、光線力学殺菌療法において生成される一重項酸素測定にはどの方法が最適であるかを調べた。

一重項酸素生成のための光感受性物質としてローズベンガル (和光純薬) を用いて、最適な一重項酸素測定法の検証を行った。ローズベンガルは歯垢染め出し液としても利用されている物質であり、口腔内で用いることができる光感受性物質の一つである。このローズベンガルに対して、励起波長である 532 nm のレーザーを照射することで生成される一重項酸素を測定の対象とした。実験には図 3 に示すような試作装置を製作して用いた。

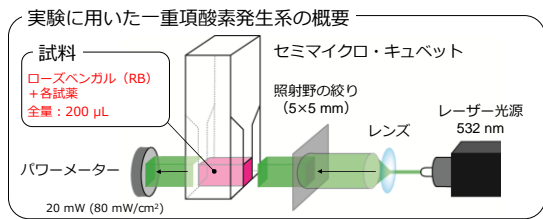


図 3. 実験装置の概要

比較検討を行った測定法は以下に示す 3 つとした；①環状アミンを用いた電子スピン共鳴 (ESR) 法、② 1,3-diphenylisobenzofuran (DPIBF) の比色分析法、および③蛍光プローブ法 (Singlet Oxygen Sensor Green, SOSG)。

①環状アミンを用いた ESR 法の測定原理を図 4 に示す。

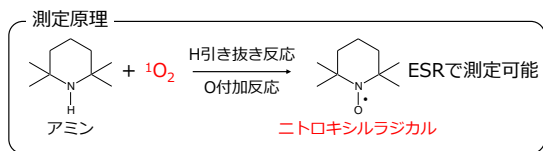


図 4. ESR 法の測定原理

ESR はラジカル化した原子・分子を測定するための装置であり、一重項酸素の酸化力により環状アミンをラジカル化させて測定するという方法である。実験には次の 4 つの環状アミンを用いた。

- 2, 2, 6, 6-tetramethylpiperidine (TEMP)

- 2, 2, 6, 6-tetramethyl-4-piperidon (4-oxo-TEMP)
- 2, 2, 6, 6-tetramethyl-4-piperidinol (4-hydroxy-TEMP)
- 2, 2, 5, 5-tetramethyl-3-pyrroline-3-carboxamide (TPC)

(上記いずれの試薬も Sigma-Ardrich 製)
TEMP のみ疎水性のためエタノールを溶媒とし、それ以外のアミンは超純水に溶かして実験に用いた。図 3 に示した装置で処理後、試料を専用石英セルに吸引し、ESR (JEOL、FA-100) を用いて測定を行った。

②DPIBF の比色分析法の測定原理を図 5 に示す。

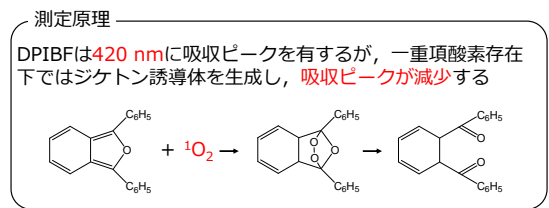


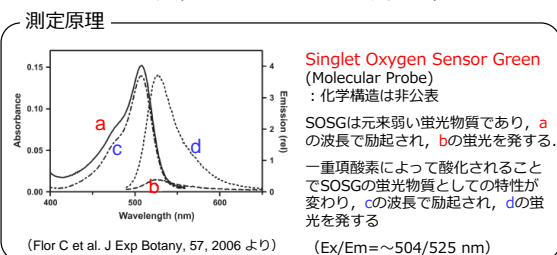
図 5. DPIBF 法の測定原理

DPIBF 吸光スペクトルのピークを 420 nm に有するが、一重項酸素により酸化されるとジケトン誘導体となり、その吸光スペクトルが減少する。従って、420 nm の吸光度を分析することで一重項酸素の生成量を評価することができる。

DPIBF (Sigma-Ardrich) をエタノール中に溶解し、その後超純水を用いて希釈を行った。図 3 に示した装置で処理後、試料の比色分析を分光光度計 (GE Healthcare, Nanovue) を用いて行った。

③蛍光プローブ法として、市販の一重項酸素蛍光プローブである Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG, Molecular Probe) を用いて行った。測定原理を図 6 に示す。

図 6. 蛍光プローブ法の測定原理



蛍光プローブ法では、蛍光プローブが一重項酸素との反応により蛍光物質へと変化する性質を利用した測定法であり、蛍光測定を行うことで一重項酸素の生成量を評価することができる。

図 3 に示した装置で処理後、試料の蛍光測定をマイクロプレートリーダー (Beckman、

DTX880) を用いて Ex/Em=485/535 nm で行った。

①～③のいずれの実験において各測定に用いる試薬の濃度、ローズベンガルの濃度、レーザー照射時間、の影響を調べ、光線力学療法において生成される一重項酸素の定量分析に適した測定法の検討を行った。

4. 研究成果

(1) 種々の光感受性物質を用いた殺菌試験
各光感受性物質を最終濃度 10 μM および 100 μM で細菌懸濁液と混和して実験を行った結果をそれぞれ、図 7、8 に示す。

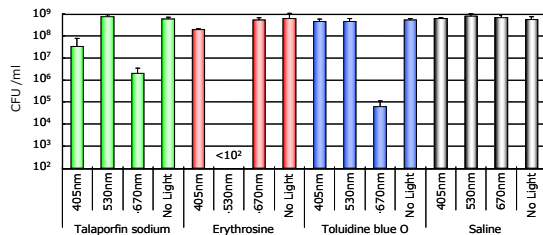


図 7. 光感受性物質を濃度 10 μM で用いた場合の殺菌試験。(Saline:生理食塩水)

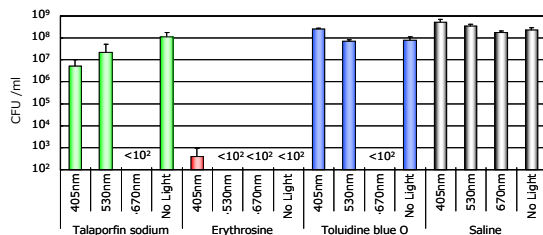


図 8. 光感受性物質を濃度 100 μM で用いた場合の殺菌試験。(Saline:生理食塩水)

図 7 に示すように、各光感受性物質の濃度が 10 μM と非常に低濃度であってもそれぞれの励起波長を照射することで、殺菌効果が発揮され、残存細菌数の桁数が減少した。タラポルフィンナトリウムの場合には 2 ケタ、エリスロシンの場合には 6 ケタ以上、トルイジンブルーの場合には 4 ケタの細菌数の減少が認められた。一方、コントロールとして用いた生理食塩水のみの場合には殺菌効果は認められなかった。また、光感受性物質が存在しても光照射を行わない場合あるいは励起波長以外で光照射を行った場合にも殺菌効果はほとんど認められなかった。従って殺菌効果は LED 照射のみあるいは光感受性物質自体によるものではないということがわかった。

図 8 に示すように、各光感受性物質の濃度を 100 μM に上げると殺菌効果が高まった。いずれの光感受性物質の場合においても、励起波長を照射すると 6 ケタ以上の細菌数の減

少、すなわち殺菌効果が認められた。しかしながら、エリスロシンの場合には、光照射を行わない場合、あるいは励起波長以外の波長を照射した場合においても 6 ケタ程度差菌数の減少が認められた。従って、エリスロシンは 100 μM で用いた場合には黄色ブドウ球菌に対して細胞毒性を発揮することがわかった。このように、光感受性物質自体が毒性を持つ場合には、口腔内で用いた場合に正常組織に対しても毒性を発揮する可能性があるため、今後安全性試験を実施する予定である。安全性試験を通して、口腔内光線力学療法で使用する最適な光感受性物質の種類と濃度を評価することが今後の課題であると考えられる。

(2) 一重項酸素定量分析法の比較検討

①環状アミンを用いた ESR 法

いずれの環状アミンを用いた場合にも、アミン濃度、ローズベンガル濃度、レーザー照射時間に伴って測定値(ニトロキシラジカル量)が増加することが確認された。TEMP を用いた場合の代表的な ESR シグナルを図 9 に示す。

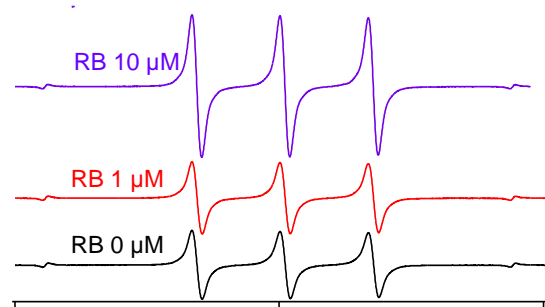


図 9. 各濃度のローズベンガル (RB) から生成された一重項酸素と TEMP が反応してラジカル化したニトロキシラジカルの ESR シグナル。

しかしながら、TEMP と 4-oxo-TEMP の場合にはローズベンガルが添加されていない場合においてもニトロキシラジカルの ESR シグナルが計測された。すなわち、これら 2 つの環状アミンではバックグラウンドとしての ESR シグナルが大きいので、4-hydroxy-TEMP や TPC の方が一重項酸素定量分析に適していることが示唆された。4-hydroxy-TEMP と TPC を用いてローズベンガルの濃度を変化させて測定を行った結果を図 10 に示す。いずれの場合にもローズベンガル濃度が 10~20 μM となると測定値が飽和する現象が認められた。これは、ローズベンガルの濃度増加に伴って試料の着色度合いが強くなるために励起光となるレーザー光が透過しにくくなり、結果として生成される一重項酸素量が減少したためと考えられる。

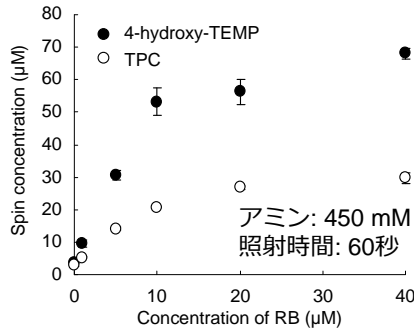


図 10. ESR 法におけるローズベンガル濃度の影響

②DPIBF の比色分析法

DPIBF 法では、ローズベンガル濃度、レーザー照射時間に伴って測定値 (420 nm の吸光度) が減少した。すなわち、一重項酸素の生成量が増加されることが確認された。ローズベンガル濃度の増加に伴った DPIBF の吸光スペクトルの変化を図 11 に示す。

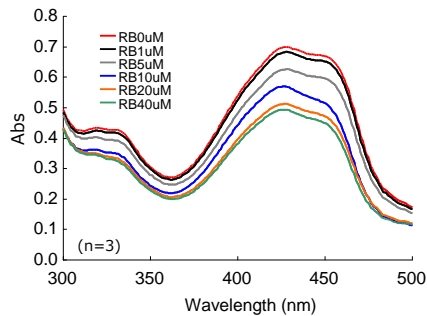


図 11. DPIBF 吸光スペクトルの変化

DPIBF の吸光スペクトル分析の結果より 420 nm における吸光度だけをプロットすると図 12 のようになり、ESR 法と同じくローズベンガル濃度の増加に伴って一重項酸素の生成量も増加するが、ローズベンガル濃度が約 20 μM となるとそれ以上の増加は認められなくなった。これに関してもローズベンガル濃度の増加に伴う試料着色度合いが強くなったためと考えられる。

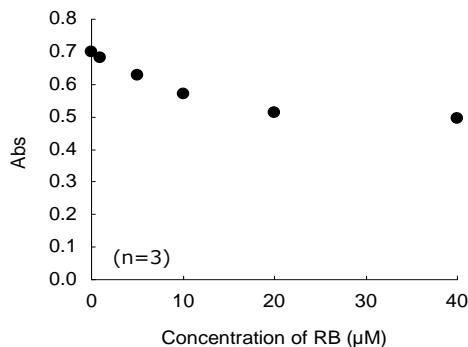


図 12. DPIBF の吸光ピークの変化

しかしながら、DPIBF に 400 nm の光照射を行うと、光感受性物質と混和していなくても吸光スペクトルが著しく変化することがわかった (Data not shown)。したがって、ローズベンガルを用いた測定は可能であるが、ヘマトポルフィリン誘導体などのように励起波長が 400 nm 付近の光感受性物質を用いる場合の一重項酸素測定には不適であることが示唆された。

③SOSG を用いた蛍光プローブ法

SOSG 法にも、ローズベンガル濃度、レーザー照射時間に伴って測定値 (420 nm の吸光度) が増加することが確認された。ローズベンガル濃度の増加に伴った DPIBF の吸光スペクトルの変化を図 13 に示す。

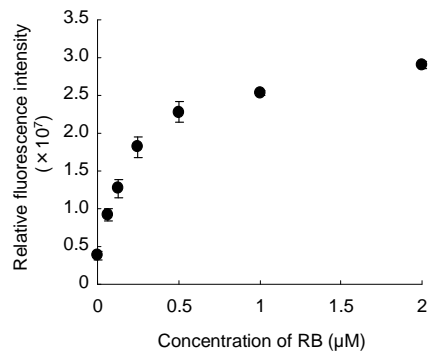


図 13. SOSG 法による測定結果

しかしながら、SOSG 法では、ローズベンガルが約 1 μM の時に測定値が飽和した。これは、蛍光を測定するという性質上、他の 2 つの測定方法よりもよりローズベンガルによる試料着色の影響を受けたためと考えられる。一方、SOSG 法ではローズベンガル濃度が 0.06 μM の時の一重項酸素生成も計測することが可能であり、測定感度としては最も高いことがわかった。

以上の結果より光線力学殺菌療法において生成される一重項酸素の定量分析には環状アミンを用いた ESR 法が適していることが示された。今後、本研究の結果を応用して光線力学殺菌療法で生成される一重項酸素量と殺菌効果を比較することで、最適な光感受性物質の同定を行っていく。新しい歯科殺菌療法として光線力学殺菌療法を臨床応用するために、今後、安全性試験および動物実験を実施し、最適条件を探索する必要がある。

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 5 件)

1. Nakamura K et al. Reevaluation of Analytical Methods for Photogenerated Singlet Oxygen. J Clin Biochem Nutr, 2011, in press (査読有) .
2. Ikai H, Nakamura K et al. Photolysis of hydrogen peroxide, an effective disinfection system via hydroxyl radical formation. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54, 5086-5091 (査読有)
3. Nakamura K et al. A novel analytical method to evaluate directly catalase activity of microorganisms and mammalian cells by ESR oximetry. Free Radical Res, 2010, 44, 1036-1043 (査読有)
4. Nakamura K et al. Reevaluation of quantitative ESR spin trapping analysis of hydroxyl radical by applying sonolysis of water as a model system. Bull Chem Soc Jpn, 2010, 83, 1037-1046 (査読有)
5. Nakamura K et al. Zirconia as a dental implant abutment material: A systematic review. Int J Prosthodont, 2010, 23, 299-309 (査読有)

[学会発表] (計 10 件)

1. Ishiyama K, Nakamura K et al. Reevaluation of Analytical Methods for Photogenerated Singlet Oxygen. The 4th International Symposium for Interface Oral Health Science, 2011/3/8, Sendai
2. Yamada Y, Nakamura K et al. Influence of hydroxyl radical generated by photolysis of H₂O₂ on corrosion behavior of dental metals. The 4th International Symposium for Interface Oral Health Science, 2011/3/8, Sendai
3. Ikai H, Nakamura K et al. Bactericidal effect of hydroxyl radical generated by photolysis of hydrogen peroxide. The 4th International Symposium for Interface Oral Health Science, 2011/3/8, Sendai
4. Shirato M, Ikai H, Nakamura K et al.

Booster effect of thermal energy on bactericidal action of hydroxyl radical generated by photolysis of H₂O₂. The 4th International Symposium for Interface Oral Health Science, 2011/3/8, Sendai

5. 石山希里香, 中村圭祐ら. 光線力学殺菌療法における一重項酸素生成量評価法の検討. 第 25 回日本酸化ストレス学会関東支部学術大会. 2010 年 12 月 11 日, 東京
6. 中村圭祐ら. ESR オキシメトリー法を応用した微生物および動物細胞の新しいカタラーゼ活性測定法. 第 63 回日本酸化ストレス学会. 2010 年 6 月 24 日, 神奈川

[図書] (計 4 件)

1. Nakamura K et al. Springer, Bactericidal effect of photodynamic therapy. 2010, 232-233.
2. Kanno T, Hayashi E, Ikai H, Nakamura K et al. Springer, Denture plaque removal efficacy of denture cleansing device utilizing radical disinfection ability of activated low concentration H₂O₂. 2010, 252-253.
3. Hayashi E, Tada M, Kanno T, Ikai H, Nakamura K et al. Springer, Transmitted laser beam power of the resin washed by experimental washing machine for dentures. 2010, 255-256.
4. Ikai H, Kanno T, Nakamura K et al. Springer, The evaluation of the dental disinfection device with low concentration of H₂O₂ and laser diode. 2010, 257-258.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 圭祐 (NAKAMURA KEISUKE)
東北大学・未来科学技術共同研究センター・助教
研究者番号 : 30431589

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :