

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：32667

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24792368

研究課題名(和文)多波長LED照射による歯周疾患予防効果の向上

研究課題名(英文)Improvement of preventive effect on periodontal disease using multi-wavelength LED

## 研究代表者

石黒 一美(Ishiguro, Hitomi)

日本歯科大学・生命歯学部・助教

研究者番号：20508486

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)：日常生活でも使用されているLED光を用いた安全で効果的な歯周疾患の予防方法を確立するために基礎的な研究を行った。

歯周病原細菌に対しては青色LED単独照射や、白色LED光と光増感剤を組合わせた照射方法で殺菌効果が得られた。一方、ヒト歯肉線維芽細胞に対して波長の異なるLED光を単独照射したところ、赤色LEDは細胞増殖率に影響がなかったが、強い照射出力の青色LEDを照射すると細胞増殖率が減少した。これらことから、LED光は歯周病原菌の殺菌作用を有するが、照射される周囲組織に対する安全性を配慮した照射条件を検討する必要があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Our study was aimed at building a foundation for safe and effective means to prevent periodontal diseases using light-emitting diode (LED) light, which is commonly used in daily living.

We found that irradiation with blue LED light alone or in combination with white LED light and a photosensitizer was capable of killing bacteria that cause periodontal disease. We also tested growth of human gingival fibroblasts irradiated with LED light of varying wavelengths, and found that the cell growth rate was reduced by irradiation with high-power blue LED light, while red LED light did not affect the cell growth.

These results suggested that LED light have an effect on killing periodontal bacteria, but optimal irradiation conditions should be sought to address the safety to irradiated surrounding periodontal tissues.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周病 LED 歯周病原細菌 歯肉線維芽細胞

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 歯周治療での光の応用

レーザーなどのある特定の波長を持つ光を応用した歯科治療が行われるようになり、歯周疾患の治療においても歯石の除去、炎症性歯周ポケットの搔爬、歯周ポケット内の細菌の殺菌、メラニン色素沈着症の改善といった様々な用途で様々な歯科用レーザーが普及した。一方、そして、近年、私達の日常生活でも頻りに利用されるようになった LED (Light Emitting Diode) による歯周疾患の治療・予防に関する基礎的な研究が進められるようになった。しかしながら、そのターゲットは歯周病原細菌の殺菌効果であり、宿主細胞への影響は明らかではなかった。

### (2) LED 光の波長・照射条件

皮膚科領域ではアクネ菌によるニキビ治療には青色 LED による殺菌、血液循環の促進・コラーゲン生成を増殖させてシワやたるみを赤色 LED により改善させるというように、LED の波長による効果の違いから使用用途を区別するようになっていた。歯周治療において適切な波長、また安全で効果的な照射条件についての検討はなされていなかった。

## 2. 研究の目的

歯周疾患の治療に有効であると考えられる数種類の波長の LED を用いて、歯周病原性細菌、ヒト歯周組織由来細胞に与える影響を明らかにする。

(1) 歯周病原性細菌の増殖抑制、殺菌効果を検討する。

(2) ヒト正常歯肉線維芽細胞 (Gin-1) に与える影響を *in vitro* で検討する。

(3) 白色 LED 光を用いた光線力学療法が歯周治療に効果的かを検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) LED 照射装置の作製

波長の異なる LED 光源を用いて、照射出力条件を調節することができる LED 照射装置を作製した。本研究で用いた主に用いた LED 光の波長を以下に示す。

青色 LED : ピーク波長 405nm (図 1)

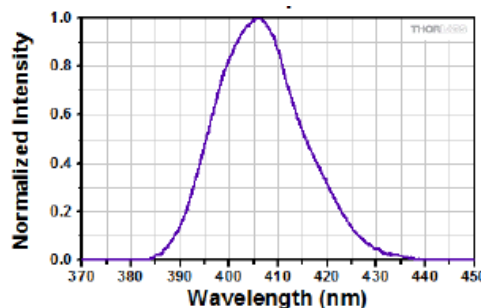


図 1 青色 LED のスペクトル

赤色 LED : ピーク波長 660nm (図 2)

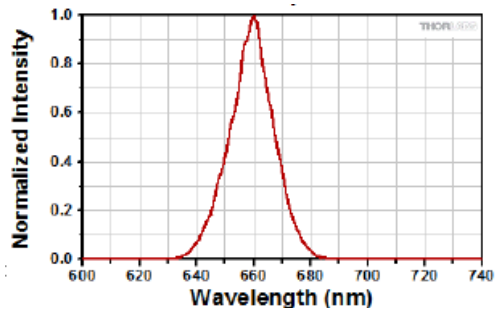


図 2 赤色 LED 光のスペクトル

疑似白色 LED : ピーク波長 450nm (図 3)

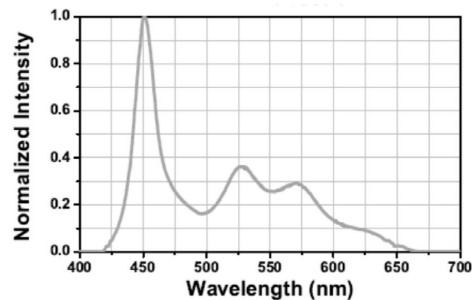


図 3 疑似白色 LED 光のスペクトル

### (2) 歯周病原細菌への影響

#### 菌液の調整

*Porphyromonas gingivalis*; ATCC33277 株を Hemine/Menadione 添加 BHI 液体培地にて 48 時間嫌気培養し、集菌・洗浄、OD=0.3 (660nm) に調整した菌液を用いた。

#### LED の照射

96 well 透明平底プレートに 100  $\mu$ L/well 分注し、プレート底面から LED 光源の非球面レンズまでの距離が 15 mm になるよう照射距離を一定にして、下方から LED 光を照射した。

#### 殺菌効果の判定

菌液を連続段階希釈後、Hemine/Menadione 添加血液寒天培地に播種、7 日間嫌気培養後、コロニー数を計測して CFU ; Colony Forming Unit とした。

### (3) 細胞への影響

#### 細胞の培養

ヒト正常歯肉線維芽細胞株 (Gin-1, 6 継代目) を 96 well 透明平底プレートに 1,500 cells /well とするよう播種し、15% FBS 含有 DMEM/F12 培地にて 24 時間培養した。

#### LED の照射

培地は添加したまま、96 well 透明平底プレート底面から LED 光源の非球面レンズまでの距離が 15 mm になるよう照射距離を一定にして、下方から LED 光を照射した。

### 細胞増殖・抑制の判定

LED 照射後に 48 時間培養後、MTT 改良法に準じた Cell Counting Kit-8 (株式会社同仁化学制約) 試薬を用いて、通法に従い測定を行った。すなわち、試薬を添加、CO<sub>2</sub> インキュベーター内(37℃)で 2 時間呈色反応を行い、マイクロプレートリーダーで吸光度 (450nm) を測定した。

## 4. 研究成果

### (1) 作製した LED 装置の特性

今までに報告された論文で用いられている照射装置は、光源が特定されており、1 波長であることも多かった。また、複数波長の比較をしている報告でも、既存の照射装置を用いており、出力条件が制限されていた。

本研究のために作製した照射装置は波長の異なる LED ライトを取り付けることが可能である。また、照射出力 (W) を調節することができる。そのため、単位面積当たりのエネルギー量 (J/cm<sup>2</sup>) が同じであったとしても、波長と出力による変化を比較することができるようになった。

### (2) LED 照射による *P. gingivalis* 殺菌効果

#### 青色 LED の殺菌効果

青色 LED が様々な細菌に対し殺菌作用を有することは以前より報告されている。これは、*P. gingivalis* が産生する光感受性物質 ポルフィリンが LED 光を吸収し、一重項酸素が生成されるためである。

本研究の結果でも、*P. gingivalis* は青色 LED 光を照射しただけで CFU が有意に減少した (図 4)。

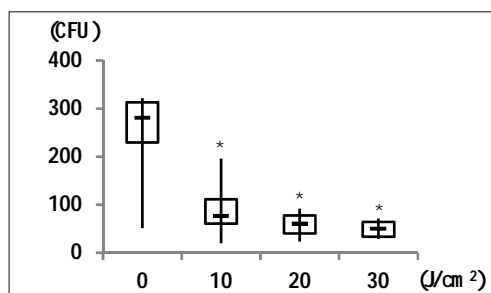


図 4 青色 LED の *P.g* 殺菌効果

#### 疑似白色 LED の殺菌作用

図 3 に示したように、本研究で用いた白色 LED は、いわゆる疑似白色 LED であり、約 450nm 波長帯域をピーク波長とした青色 LED に、黄色蛍光体を用いているため 480-680 nm の広帯域にもピーク波長 (約 550 nm) を有している。ポルフィリンの光吸収スペクトルは、Soret 帯と呼ばれる 450nm 付近に強い極大吸収を有するが、それ以外にも、600-900nm にわたる弱い光吸収を示す領域 (Q 帯) が存在する。そのため、疑似白色 LED を照射しても、*P. gingivalis* の殺菌効果が得られるのではないかと考えられる。

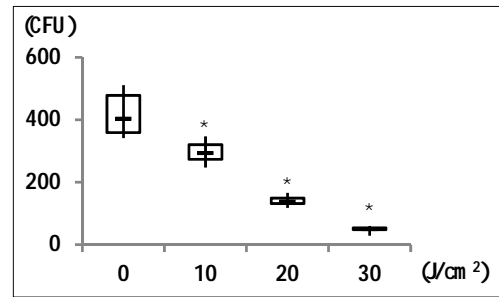


図 5 白色 LED の *P.g* 殺菌効果

図 5 に示すように、白色 LED も青色 LED と同様に *P. gingivalis* に対する殺菌効果が認められた。

### (3) LED 光が細胞に与える影響

作製した LED 照射装置を用いたことで、青色 LED と赤色 LED を比較するだけでなく、LED の出力を変化させて細胞増殖能を調べた。

#### 青色 LED が細胞に与える影響

10J/cm<sup>2</sup> では出力を変えても細胞増殖能に変化は見られなかったが、20J/cm<sup>2</sup> では 0.3W のみ、30J/cm<sup>2</sup> では全出力で細胞増殖が抑制された (表 1)。

表 1 青色 LED 光の細胞への影響

	0.1W	0.2W	0.3W
10J/cm <sup>2</sup>	N.S.	N.S.	N.S.
20J/cm <sup>2</sup>	N.S.	N.S.	p<0.05
30J/cm <sup>2</sup>	p<0.05	p<0.05	p<0.05

#### 赤色 LED が細胞に与える影響

全照射条件で細胞増殖に影響はなかった (表 2)。

表 2 赤色 LED 光の細胞への影響

	0.1W	0.2W	0.3W
10J/cm <sup>2</sup>	N.S.	N.S.	N.S.
20J/cm <sup>2</sup>	N.S.	N.S.	N.S.
30J/cm <sup>2</sup>	N.S.	N.S.	N.S.

\* 表 1, 2 は LED 非照射群と LED 照射群の結果を Mann-Whitney U-test にて統計学的に解析し、有意水準は p<0.05 とした。

### (4) 白色 LED の可能性

赤色、青色といった単色光を使用すると口腔内本来の色とは異なった見え方をしてしまう可能性がある。一方、白色 LED は口腔内本来の色をより明るく捉えることができる。小型・薄型・軽量であることや耐久性に優れていることから、セルフケアでの歯周予防に適しており、応用が期待できる。

<引用文献>

ソーラボジャパン株式会社  
http://www.thorlabs.jp/

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1件)

大久保美佐, 石黒一美, 中田智之, 沼部幸博, 白色 LED 照射による *Porphyromonas gingivalis* の殺菌効果、日本レーザー歯学会誌、査読有、24 巻 2 号、2013、pp.68-71  
DOI : 10.5984/jjpnsoclaserdent.24.68

〔学会発表〕(計4件)

石黒一美, 倉治竜太郎, 荒井俊輔, 村檉悦子, 沼部幸博, LED 照射が歯肉線維芽細胞に与える影響 - 波長と出力による違い -、第 26 回 日本レーザー歯学会学術大会、2014 年 12 月 6 日～2014 年 12 月 7 日、タワーホール船堀(東京都江戸川区)

沼部幸博, 白色 LED の歯周治療への応用 - 基礎研究と臨床応用への検討 -、第 13 回 日本歯科用レーザー学会学術大会 シンポジウム(招待講演)、2013 年 9 月 28 日～2013 年 9 月 29 日、ベルサール新宿グランド(東京都新宿区)

大久保美佐, 中田智久, 井口一美, 沼部幸博, 400-450nm 波長帯領域 LED (Light Emitting Diode) の *Porphyromonas gingivalis* に対する殺菌効果、第 24 回 日本レーザー歯学会学術大会、2012 年 12 月 1 日～2012 年 12 月 2 日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

黒澤秀一, 新木志門, 井口一美, 中田智之, 関野 愉, 沼部幸博, LED を用いた新規歯周病予防法の開発、第 22 回 日本歯科医学会学術大会、2012 年 11 月 9 日～2012 年 11 月 11 日、大阪国際会議場・インテックス大阪(大阪府大阪市)

〔図書〕なし

〔産業財産権〕なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

石黒 一美 (ISHIGURO, Hitomi)  
日本歯科大学・生命歯学部・助教  
研究者番号：20508486

(2)連携研究者

沼部 幸博 (NUMABE, Yukihiro)  
日本歯科大学・生命歯学部・教授  
研究者番号：90198557

村檉 悦子 (MURAKASHI, Etsuko)  
日本歯科大学・生命歯学部・講師  
研究者番号：40409222

(3)研究協力者

大久保 美佐 (OKUBO, Misa)