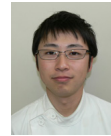


半導体レーザーと光感受性物質を用いた aPDTが上皮細胞に与える影響



○藤村岳樹¹、福田光男¹、三谷章雄¹、大澤数洋¹、永原絢子¹、山本浩充²、佐藤聡太¹、高橋伸行¹、須賀貴行¹、渡辺智久¹、佐々公太¹、野口俊英¹



1 愛知学院大学歯学部歯周病学講座、2 愛知学院大学薬学部製剤学講座

目的

歯周病は歯周病関連細菌による感染症であり、罹患部位である歯周ポケット内には多数の細菌が生息している。そのため歯周治療として、歯周ポケット内細菌の除去が重要であり、スケーリング・ルートプレーニングおよび歯周ポケット内への薬剤投与が行われてきた。近年、歯周ポケット内へのNd:YAGレーザーやEr:YAGレーザー照射は歯周病原菌の抑制効果があることが報告されているが、より高い効果を得るためにはレーザーの照射出力を上げる必要があるという問題点が残る。

一方、最近、医科領域でPhotodynamic therapy (PDT)という治療法が開発され、臨床に应用されている。これは単独では毒性を持たない光感受性物質と、その物質を特異的に励起させる波長の光を組み合わせることによって、選択的にエネルギーを組織局所に集中させる治療法で、主に癌治療に用いられている。この考え方を歯周レーザー治療に応用すれば、従来よりも低出力の照射で従来と同等の効果が得られ、且つ

生体への侵襲も少なくなるはずである。これまでに、我々は、光感受性物質として810nm付近の波長に吸収特性をもつインドシアニンググリーン (ICG)に注目し、半導体レーザーと併用したantimicrobial PDT (aPDT)を検出し、良好な細菌抑制効果を持つことを報告してきた。また、第22回の本学会および同機関誌(大澤数洋ら、**日歯誌**、22: 21-27, 2011)にて、臨床応用による臨床パラメーター改善について報告した。

また、本研究で、aPDT処置群で、スケーリング・ルートプレーニング群に比べ、歯周ポケットの減少が早期に生じていることを見出した。そこで、今回我々は、aPDTによる歯周治療の効果のメカニズムを解明する基礎的研究として、光感受性物質を併用した半導体レーザー照射あるいは低出力の半導体レーザー照射が歯肉上皮細胞に与える影響を検討した。

材料および方法

同意の得られた患者の歯周外科手術の際に、ICG封入ナノ粒子を歯周ポケット内で1分間滞留させた後、歯周ポケット上皮を含む歯周組織の一部を切除・回収し、直ちに凍結包埋した。その後、凍結切片を作成しICG封入ナノ粒子の組織内浸達を観察した。

ヒト口腔扁平上皮細胞株SCC-25あるいはヒト歯肉上皮細胞株Ca9-22を10%FBS添加DMEMにて懸濁し、培養をおこなった。光感受性物質として、これまでの我々の報告と同様、キトサンコーティング処理したICG封入ナノ粒子を作成し、wound healing assayに用いた。SCC-25細胞をサブコンフルエントな状態まで培養後、プレート上でマイクロビペット先端(直径約1.2mm)にてスクラッチし、半導体レーザー(P-LASER[®]、Panasonic社製、大阪)あるいはICG封入ナノ粒子を併用した半導体レーザー照射を行い、48時間培養して、wound healing assayを行った。照射条件は、臨床研究で用いたものと同様の設定で、平均

出力0.5W、RPTモード(デューティー比10%、パルス幅100ms、ピーク出力5W)とし、照射距離を2cmに設定し、間欠的に合計60秒間の照射を行った。

次に、光感受性物質を用いない場合の低出力の半導体レーザー照射が、歯肉上皮細胞の接着分子(ICAM-1、Integrin $\alpha_5\beta_1$)タンパク質発現へ与える影響を検討した。まず、Ca9-22に*Escherichia coli*由来Lipopolysaccharide (LPS)を添加し、刺激1時間後に半導体レーザー照射を行い、24時間培養後、フローサイトメーターにて解析した。さらに、低出力の半導体レーザー照射が、歯肉上皮細胞における炎症性サイトカインIL-8のmRNA発現に及ぼす影響を検討した。Ca9-22にLPSを添加し、刺激1時間後に半導体レーザー照射を行い、さらに1時間培養した。その後、細胞を回収し、total RNAを抽出後、通常に従ってqPCRにて解析した。

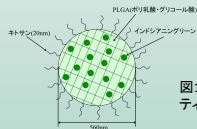
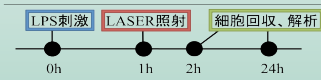


図1: 今回用いたキトサンコーティング処理ICG封入ナノ粒子

実験スケジュール (フローサイトメーター、qPCR)



結果

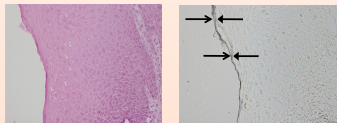


図2: ICG封入ナノ粒子の組織内浸達 (x400)

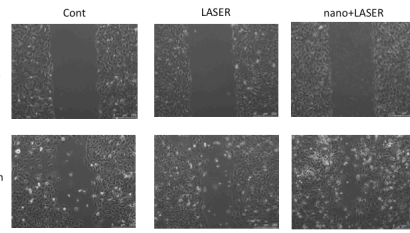


図3: Wound healing assay

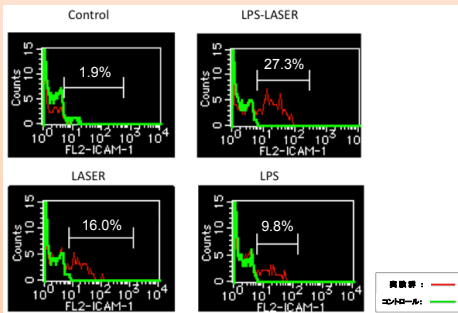


図4: ICAM-1発現

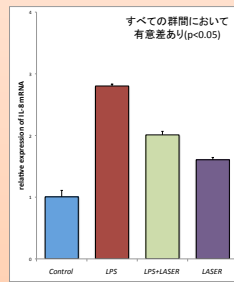


図5: IL-8 mRNA発現

ICG封入ナノ粒子は、歯肉上皮の表層までしか浸達しておらず、表層部の上皮細胞にのみ、ICG封入ナノ粒子とレーザー照射の併用効果が見られ、深部上皮細胞に対しては、レーザー照射のみの効果が見られる可能性が示唆された(図2)。wound healing assayを行った結果、上皮細胞の増殖は無刺激に比べ、aPDT群(ナノ粒子併用レーザー照射)において、より早い傾向があった(図3)。次に、半導体レーザー照射による歯肉上皮細胞の接着分子の発現変化をフローサイトメーターにて調べたところ、LPS刺激によりICAM-1の

発現増強を認めたが、LPS刺激を行った細胞にレーザー照射を行った場合、LPS刺激単独に比べおよそ3倍の発現増強が認められた(図4)。一方、Integrin $\alpha_5\beta_1$ 発現には大きな変化を認めなかった。さらに、上皮由来の代表的炎症性サイトカインであるIL-8のmRNA発現を検討したところ、LPSによって誘導されたIL-8mRNA発現亢進は、レーザー照射により有意(p<0.05)に抑制された(図5)。

考察

我々の開発したICG封入ナノ粒子は、歯肉上皮細胞層の表層のみに浸達することが明らかになった。LPS刺激されたヒト上皮細胞株では、aPDT照射によって細胞増殖・誘導が亢進し、半導体レーザー照射単独でもICAM-1の発現増強が認められた。また、歯肉上皮細胞においてLPSによって誘導されるIL-8mRNA発現は、レーザー照射により有意な抑制が認められたことより、ICG封入ナノ粒子が浸達しないエリアの上皮層では、レーザー照射による炎症抑制の可能性も示唆された。

本研究結果から、歯周治療にICG封入ナノ粒子を併用した半導体レーザー照射を応用した場合、これまでに我々が報告してきた殺菌作用に加え、歯肉上皮細胞を介した免疫応答を高めると同時に、過剰な炎症も抑制することで、早期の創傷治癒に寄与している可能性が示唆された。したがって、我々の開発したICG封入ナノ粒子を利用したaPDTは、低侵襲性の治療法として、歯周治療において非常に有用であると思われる。