

I. 緒言

Photodynamic therapy (PDT) は腫瘍細胞への特異的な集積性をもつ光感受性物質とレーザー照射を用いた癌治療の一つである。光感受性物質は最大吸収波長の光により励起され、酸素とエネルギー交換することによって一重項酸素を発生させる。PDTはこの一重項酸素のもつ細胞障害性により正常組織に影響を与えることなく癌細胞を破壊するものである。また、細菌を標的としたPDTはantimicrobial photodynamic therapy (aPDT) と呼ばれ、正常組織に影響を与えることなく病原性細菌を破壊する新しい手法であり、歯周病治療においても有効であることが示唆されている。近年、当講座では最大吸収波長を800nmにもつ光感受性物質であるインドシアニングリーン (ICG)に着目し、これを封入したナノ粒子にキトサン修飾を施したものを開発し、aPDTに関する基礎的研究を行ってきた。

近年、lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) の内因性阻害物質である developmental endothelial locus-1 (Del-1) が interleukin-17 (IL-17) による炎症性歯槽骨破壊を抑制することが報告され、Del-1がIL-17関連の免疫応答で大きな役割を担っていることが示唆された。

上皮細胞由来の炎症性サイトカインであるIL-6とIL-8は歯周病の発症と進行に関与していることが知られている。またIL-6は破骨細胞による炎症性骨吸収に、IL-8は炎症巣への好中球遊走の促進に、それぞれ深く関与することが知られている。

また、intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) は好中球の血管内皮細胞への接着においてだけでなく、創傷治癒においても重要な役割を担う事が知られている。

本研究ではICGナノ粒子を併用した低出力の半導体レーザー照射もしくは、低出力半導体レーザー照射単独での口腔上皮細胞への影響を検討することを目的とし、ヒト口腔上皮細胞株を用いた基礎的研究を行った。

II. 材料および方法

1. 光感受性物質

生体内分解性・生体適合性高分子であるポリ乳酸グリコール酸共重合体 (PLGA) を基剤とし、光感受性物質としてのICGを封入したナノ粒子を油中エマルション溶媒拡散法により調製した。さらに調製後のICG封入PLGAナノ粒子表面をカチオン性ポリマーであるキトサンで表面修飾した。さらに凝集防止剤としてマンニトールを添加した。

調製後のナノ粒子は平均粒子径 560nm である。ICG 封入ナノ粒子の使用濃度は 10mg/ml に調製して使用した。

2. ICG 封入ナノ粒子の組織への到達

1) 被験者

被験者は歯周病治療のため、愛知学院大学歯学部附属病院歯周病科に来科し、本研究(愛知学院大学歯学部倫理委員会 承認番号 134)の主旨を理解し、協力に同意の得られた 8 名とした。

2) 実験方法

局所麻酔後、歯周ポケット内へ ICG 封入ナノ粒子を注入し、1 分経過した後に歯肉を内斜切開し歯肉サンプルを得た。得られた歯肉サンプルは川本法(凍結切片作成法)に従い専用の包埋剤で包埋し、Cryostat を用いて厚さ 5 μ m の連続組織切片を作製した。組織切片はヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った後、光学顕微鏡で観察した。

3. 細胞培養

ヒト口腔上皮細胞株である Ca9-22 および SCC-25 を Dulbecco's modified Eagle's medium にて培養した。

Ca9-22 を 12well プレート上に 5×10^4 cells/well にて播種し、培養開始より 24 時間の時点で interferon- γ (1,000IU/mL) で前処理を行った。さらに 24 時間後に *Escherichia coli* 由来の lipopolysaccharide (LPS) (1 μ g/mL) にて刺激した。さらに LPS 刺激より 1 時間後に半導体レーザー照射を行った。レーザー照射より 2 時間後に qPCR に用いる細胞の回収、24 時間後にフローサイトメーターに用いる細胞の回収をそれぞれ行った。

SCC-25 は 5×10^5 cells/mL にて 6well プレートに播種し、wound healing assay に用いた。

4. 半導体レーザー

使用した半導体レーザーは、中心波長 805 ± 20 nm、導光用ファイバーの先端径は 400 μ m である。照射モードは繰り返しパルス照射 (RPT) モード (デューティ比 : 10%、

パルス幅：100ms、ピーク出力：5W) に設定し、照射距離1 cm で照射時間は60 秒間とした。

5. 定量的Real-Time PCR法 (qPCR)

Ca-22 のTotalRNA を抽出し、通法に従いqPCR を行った。データ解析は $\Delta\Delta Ct$ 法を用いた。内在性コントロールとして18S rRNA 特異的プローブ、プライマーを用い、De1-1、IL-8 および IL-6 の遺伝子発現について検討した。

6. フローサイトメトリー

Ca9-22 上の ICAM-1 は発現の確認は、FACS Calibur を用いて行った。細胞をスクレーパーにて回収し、Phycoerythrin 標識抗ヒト ICAM-1 抗体により4℃で30分反応させたのち解析を行った。また、同一アイソタイプのコントロール抗体で標識をした細胞をコントロール群とした。

7. Wound healing assay

SCC-25 を6well プレートでサブコンフルエントになるまで培養した。直径1.2 mmのP1000 ピペットチップ先端にてウェルの細胞を剥離し、PBS で洗浄した。さらに ICG 封入ナノ粒子の添加と半導体レーザーの照射を行った後に培養した。培養開始時および培養後48時間の剥離部の閉鎖状態を画像解析ソフト Image J を用いて解析した。

8. 統計学的解析

統計学的解析には統計解析ソフト SPSS を用いた。one-way ANOVA (Bonferroni correction) を用いて検討し、危険率は $p < 0.05$ をもって有意とした。

III. 結果

1. ICG 封入ナノ粒子の組織への到達

ICG 封入ナノ粒子は上皮組織の深層や結合組織には到達しておらず、上皮組織の表層においてのみ観察された。この結果より ICG ナノ粒子と半導体レーザー照射の併用による aPDT 効果は歯周ポケット内および歯肉上皮組織表層に限定されると考えられた。また、ICG 封入ナノ粒子の到達していない歯肉上皮組織においては半導体レーザー照射単独の影響がみられる可能性が示唆された。

2. 上皮細胞に対する半導体レーザー照射および aPDT の影響

半導体レーザー照射を行った場合に菌周ポケットを含む上皮細胞の炎症反応に影響を与えるかどうか検討するために、レーザー照射のみによる炎症関連遺伝子発現の解析を行った。

炎症性サイトカインである IL-17 発現を抑制する抗炎症物質であると考えられている De1-1 mRNA 発現に関しての検討を行った。半導体レーザー照射により De1-1 mRNA 発現はコントロール群と比較して有意に増強していた ($p < 0.01$)。また、LPS 刺激を行った上皮細胞においても同様に De1-1 mRNA 発現は増強していた。次に炎症性サイトカインである IL-6 および IL-8 について検討した。IL-6、8 ともに LPS 刺激を行った上皮細胞においてコントロール群と比較して有意な mRNA 発現の上昇を認めた。また LPS 刺激により上昇した IL-6、8 の mRNA 発現は半導体レーザー照射を行った群において有意に減少していた ($p < 0.01$)。

ICAM-1 は ICAM-1 ノックアウトマウスにおいて創傷治癒が遅延したという報告があり、本研究では創傷治癒のマーカーとして用い、LPS で刺激した上皮細胞への半導体レーザー照射により ICAM-1 発現がどう変化するかを検討した。ICAM-1 陽性細胞の割合はコントロール群で $1.92 \pm 0.42\%$ 、LPS 刺激群で $12.08 \pm 1.87\%$ 、LPS 刺激+レーザー照射群で $30.99 \pm 4.31\%$ 、レーザー照射群で $18.81 \pm 2.74\%$ であった。すべての実験群においてコントロール群と比較して有意な ICAM-1 発現の上昇が認められた

($p < 0.01$)。さらに、LPS 刺激+レーザー照射群では LPS 刺激群と比べ ICAM-1 の発現が3倍に増強していた。

aPDT 施術後の上皮組織における創傷治癒を検討するため、SCC-25 を用い wound healing assay を行った。細胞剥離部位が遊走、増殖した細胞で閉鎖された割合ではコントロール群と比較してレーザー照射群および aPDT 群において有意な増加が認められた ($p < 0.01$)。

IV. 考察

今回の研究で、口腔上皮細胞株に対する低出力の半導体レーザー照射により De1-1 mRNA および ICAM-1 の発現が上昇すること、IL-6 および IL-8 mRNA 発現が抑制されることが示唆された。ヒト歯肉上皮細胞株で低出力の半導体レーザー照射により De1-1

mRNA 発現が上昇したことは、aPDT 施術後の歯周組織においても De1-1 発現の上昇に伴い、IL-17 関連の炎症反応が抑制される可能性を示唆している。

また、本研究では、IL-6 および IL-8 mRNA 発現が低出力の半導体レーザー照射により抑制されることを明らかにしており、この結果は LLLT により IL-1、IL-6、IL-8 や TNF- α 発現が抑制されるという報告と合致している。また、近年の Eskin らの報告において、De1-1 は IL-17 関連炎症を制御する上皮細胞由来の新規物質とされている。Iocono らは IL-8 発現が線維芽細胞の形態や機能に影響し、創傷治癒の遅延に関与すると報告している。さらに Braham らは aPDT が IL-1 β と TNF- α を不活化し歯周組織の治癒を促進する可能性を示唆している。これらの報告と今回の結果をふまえると、低出力の半導体レーザー照射は過度な炎症の抑制と創傷治癒の促進に寄与する可能性が考えられる。

また、ナノ粒子に関しては真皮より深層に浸透する事はできないといわれているが、歯周ポケット内上皮への浸透は明らかにされていなかった。しかし今回の研究の結果より、ICG 封入ナノ粒子（平均粒子径 560nm）は歯周ポケット内上皮の表層でのみ観察され、深層には到達していない事が明らかとなった。よって、歯肉上皮組織の深層では半導体レーザー照射による創傷治癒に有利な効果が得られると考えられる。創傷治癒の促進に関しては、LLLT が線維芽細胞や骨芽細胞の増殖を促進することや、He-Ne レーザーがラットの創傷治癒を促進することが知られている。また、Nagaoka らは ICAM-1 が線維芽細胞やケラチノサイトを介し創傷治癒の遅延に寄与する可能性を示している。今回の研究では、半導体レーザー照射を行ったヒト口腔上皮細胞において ICAM-1 発現の上昇が認められた。ICAM-1 は創傷治癒においても重要な役割を担っている可能性があり、aPDT 施術により歯肉上皮組織は創傷治癒の促進という効果も得られる可能性を示唆している。

V. まとめ

これまでの研究で ICG 封入ナノ粒子を応用した aPDT が歯周病関連細菌である *P. gingivalis* に対する殺菌効果を示すことを報告した。本研究では、ICG 封入ナノ粒子を応用した aPDT により、口腔上皮細胞内において IL-6 および IL-8 発現の抑制、De1-1 および ICAM-1 発現の促進、口腔上皮細胞の遊走と増殖の促進が生じる可能性が示唆された。この結果より、歯周病関連細菌に対する殺菌能に加え、過度な炎症の抑制や創傷治癒を促進する効果が得られることが期待される。本研究により、ICG ナ

ノ粒子と半導体レーザー照射を併用した aPDT は新しい歯周病治療として有用である可能性が示唆された。