

# 学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

佐々木 康行

論文題目

歯周ポケット外照射を想定した aPDT の基礎的研究

## I. 緒言

近年、歯周病の非外科的治療の一つとして抗菌光線力学療法（以下 aPDT）が注目され始めている。aPDT とは、特定波長のレーザーを光感受性物質に照射することで、その光触媒作用により活性酸素（以下 ROS）を発生させ、細菌の細胞壁を破壊し殺菌する治療法である。低出力レーザーを用いるため熱障害が少なく、また ROS による殺菌のため、抗菌薬に対する耐性菌にも効果があるとされている。これまで申請者らの研究室では、光感受性物質として、キトサンコーティングを施したインドシアニンググリーン封入ナノ粒子（以下 ICG-Nano/c）を独自開発し、これに 810nm の半導体レーザーを照射する aPDT の研究を進め、その殺菌効果を確認し報告している。

根分岐部病変を伴う歯周炎は、非外科的処置において器具の到達が困難な病態であると知られている。一般的な aPDT では、歯周ポケット内に照射プローブを挿入し、歯軸と平行にレーザーを照射するが、根分岐部病変に対しこの方法で照射すると、方向が制限されてしまい目的の部位に十分な光を到達させることができない。そこで本研究では、新たなレーザーの照射法として、歯周ポケット外から照射し、歯肉を透過したエネルギーにより光感受性物質を励起させる方法を考案した。病変に対し様々な角度でレーザーを照射することができるため、従来の方法では光を届かせることができなかった部位まで、網羅できると考えられる。

本研究で用いる半導体レーザーの波長 (810nm) は、組織透過性が高いため、上記のような新たな照射法に応用できる可能性がある。そこで、将来的な臨床応用を見据え、*in vitro* の歯周ポケット外照射モデルを作成し、歯周ポケット外照射による aPDT の基礎的研究を行った。

## II. 材料および方法

### 1. 使用菌株

被験菌体には *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277 株を用いた。浮遊細菌サンプルには OD=0.1 に調整した菌液を使用した。また、血液寒天培地を 96 穴ディープウェルプレートに分注し固め、各ウェル中に OD=0.1 に調整した菌液を注入し、2 日間嫌気培養して寒天培地上に付着した菌体をバイオフィルムサンプルとして使用した。

### 2. 光感受性物質

ICG-Nano/c は、これまでの報告と同様の手法で作製した。すなわち、エマルジョン溶媒拡散法により、乳酸グリコール酸共重合体の基剤に ICG (オプサグリーン、参天製薬、大阪) を混合し、ナノ粒子を作製、その後キトサンコーティングを施した。

### 3. 半導体レーザー

使用した半導体レーザー (LIGHTSURGE SQUARE、長田電気工業、東京) の、中心波長は  $810 \pm 20$  nm、最大出力は 3W であった。導光用ファイバーは先端径が  $600 \mu\text{m}$  のものを使用した。照射モードは、繰り返しパルス照射モード

(デューティ比:50%、パルス幅:100ms、ピーク出力:0.5W-3W、4-24W/cm<sup>2</sup>)に設定し、照射距離1cmで、照射範囲は直径2.8mmであった。

#### 4. 歯肉モデルの要件

歯肉モデルの要件は、(1)人工物ではないこと、(2)歯肉の中で最も厚みのある口蓋歯肉より厚いこと、(3)ミオグロビンを含有すること(軟組織において最も吸収係数が高いヘモグロビンに組成が近い)とした。歯肉モデルの候補として、3mm厚にスライスした新鮮な牛肉、豚肉、鶏肉を使用した。レーザー照射した際のエネルギー透過性を、パワーメーターを用いて測定し、最も透過性の低いものを歯肉モデルとして選択した。

#### 5. 歯周ポケット外照射モデルにおける照射条件

歯周ポケット外照射が可能な出力として、以前のポケット内照射を想定した研究で殺菌に必要とされたエネルギーと、歯肉モデルを透過したエネルギーが同等となる出力を、パワーメーターを用いて測定し検討した。

#### 6. 光感受性物質による透過エネルギーの吸収

歯肉モデルを透過した光が光感受性物質を励起することを確認するため、ICG-Nano/cを加えた培地を入れた96穴プレートに、レーザーを照射し、その透過エネルギーの減弱をパワーメーターで測定した。

#### 7. 冷却法

レーザーによる熱障害を回避する冷却法を検討するために(1)連続照射、(2)間欠照射、(3)連続照射+エアー冷却、(4)間欠照射+エアー

冷却、の4群を設定し、歯肉モデルおよび ICG-Nano/c 溶液の温度上昇をサーモグラフィーを用いて測定した。

### 8. 歯周ポケット外照射モデルによる aPDT (浮遊細菌)

菌液に ICG-Nano/c の溶液を混合後、歯周ポケット外照射モデルに組み込み、レーザー照射を行い、殺菌効果を調べた (aPDT 群)。比較の対象として、ICG-Nano/c 添加及びレーザー照射を行わないコントロール群、ICG-Nano/c を添加したのみの ICG-Nano/c 群、レーザーを照射したのみのレーザー群を設定した。菌数測定は、各検体を血液寒天培地に塗抹後、嫌気状態にて7日間培養、形成されたコロニーをカウントして行った。

### 9. 歯周ポケット外照射モデルによる aPDT (バイオフィルム)

バイオフィルムに ICG-Nano/c を加えた液体培地を注入後、歯周ポケット外照射モデルに組み込み、レーザー照射を行い、殺菌効果を確認した。比較の対象は浮遊細菌の実験と同様に設定した。

### 10. 統計処理

正規性の検討を行ったところ正規分布であったため、*Dunnnett's* および *Tukey* の検定を用い、有意差を求めた。 $P < 0.05$  で統計学的に有意であるとした。

## III. 結果

### 1. 歯肉モデルの決定

どの組織片においても、出力に比例して透過エネルギーが増加した。ま

た、どの出力においても牛肉片が最も透過エネルギーが低かった。以降の実験では牛肉片を歯肉モデルとして使用した。

## 2. 歯周ポケット外照射モデルにおける照射条件の決定

2W (デューティー比: 50%、パルス幅: 100ms) のときに、以前の歯周ポケット内照射モデルでの研究で有効であったエネルギーと同等になった。

## 3. 光感受性物質による透過エネルギーの吸収確認

ICG-Nano/c を加えない培地と比較して、ICG-Nano/c 添加培地では、透過エネルギーが有意に減弱し、光感受性物質がエネルギーを吸収することが確認された。

## 4. 冷却法の決定

歯肉モデル表面、ICG-Nano/c 溶液ともに、温度上昇が最も低かったのは間欠照射+エアークーリング群 (+2.72°C、+4.94°C) であった。そのため、以降の実験では同冷却法を用いた。

## 5. 歯周ポケット外照射モデルによる aPDT の効果 (浮遊細菌)

すべての群と比較して、aPDT 群において有意な菌数の減少を認めた。また、コントロール群と比較して3分間の照射では  $2 \log_{10}$  前後の減少、5分間の照射では  $4 \log_{10}$  以上の減少が認められた。

## 6. 歯周ポケット外照射モデルによる aPDT の効果 (バイオフィルム)

コントロール群および ICG-Nano/c 群と比較して aPDT 群において有意な菌数の減少を認め、またコントロール群に対して  $1.18 \log_{10}$  の減少を認め

た。

#### IV. 考 察

本研究は、初めて歯周ポケット外からレーザー照射を想定した aPDT の研究である。最初に、歯肉モデルの選択を行った。軟組織において最も吸収係数が高いヘモグロビンに組成が近いミオグロビンを含むサンプルを候補としレーザー光の透過を比較したところ、牛肉が最も透過しにくいということが判明したため、歯肉モデルとして牛肉を選択した。また、歯肉モデルを用いて照射条件の設定を行った結果、照射出力が 2W 以上あれば歯周ポケット外照射による aPDT に必要な透過エネルギーが得られると考えられた。この照射出力は、従来の aPDT における出力と比較して高く、温度上昇による組織の熱障害を起こすリスクが上昇する。しかし、エアークーリングを行いながら、間欠的に照射することによって、組織の温度上昇を 3°C 未満に抑えることができた。また、歯肉モデルを透過したエネルギーにより光感受性物質を励起させ、ROS が発生するか間接的に確認した結果、歯肉モデルを透過したエネルギーは ICG-Nano/c に吸収されたため、ROS を発生させる可能性が示唆された。歯周ポケット外照射による浮遊細菌に対する殺菌効果は、3 分間の照射では  $2 \log_{10}$  前後の減少、5 分間の照射では  $4 \log_{10}$  以上の減少が認められた。また今回の結果は、以前申請者らの研究室が報告した ICG-Nano/c を使用した歯周ポケット内照射モデルと同等の殺菌効果を示した。また、実際の歯周ポケット内では、歯周病原細菌はバイオフィルムを

形成しているため、バイオフィルムに対する有効性を確認した。今回の実験では、3分間の照射で  $1.18 \log_{10}$  の減少が認められ、バイオフィルムにおいても殺菌効果が得られた。これらの実験結果より、歯周ポケット外照射による aPDT の臨床応用の可能性が示唆された。

## V. まとめ

本研究では、独自に設定した、aPDT の歯周ポケット外照射モデルにおいて、ICG-Nano/c と 810nm の半導体レーザーを用いることで、安全に歯周ポケット内照射モデルと同等の aPDT 効果が得られるという結果を得た。今回考案した aPDT における歯周ポケット外照射法は、歯周ポケット内にレーザープローブを挿入する必要がないため、照射方向の制限がないだけでなく、操作性の向上、感染リスクの軽減、不快感の軽減といった利点も考えられ、従来の照射方法での問題点を大きく改善できると予測される。今後、歯周ポケット外照射による aPDT の臨床応用を目指して、さらなる検証を行っていく予定である。