

歯周ポケット外照射を想定した aPDT の基礎的研究

佐々木 康行

愛知学院大学歯学部歯周病学講座
(指導：福田 光男 特殊診療科教授)

愛知学院大学大学院歯学研究科博士（歯学）学位申請論文

Newly developed irradiation method of aPDT for
inactivating periodontal pathogens

YASUYUKI SASAKI

Department of Periodontology,
School of Dentistry, Aichi Gakuin University
(Director : Prof. Mitsuo Fukuda)

The thesis submitted to the Graduate Faculty, School of Dentistry,
Aichi Gakuin University for Ph.D. degree

本論文の基盤論文は、次のような論文です。

タイトル：New Irradiation Method with Indocyanine Green-Loaded
Nanospheres for Inactivating Periodontal Pathogens

掲載誌名：International Journal of Molecular Sciences 2017, 18, 154

著者：YASUYUKI SASAKI^{1,2)}, JUN-ICHIRO HAYASHI¹⁾, TAKEKI FUJIMURA^{1,2)},
YUKI IWAMURA^{1,2)}, GENTA YAMAMOTO¹⁾, EISAKU NISHIDA¹⁾, TASUKU OHNO¹⁾,
KOSUKE OKADA¹⁾, HIROMITSU YAMAMOTO³⁾, TAKESHI KIKUCHI¹⁾,
AKIO MITANI¹⁾ and MITSUO FUKUDA^{1,2)}

所属：¹⁾ Department of Periodontology, School of Dentistry,
Aichi Gakuin University, 2-11 Suemori-dori,
Chikusa-ku, Nagoya 464-8651, Japan

²⁾ Division of Periodontal Health Promotion, Dental Hospital,
Aichi Gakuin University, 2-11 Suemori-dori, Chikusa-ku,
Nagoya 464-8651, Japan

³⁾ Department of Pharmaceutical Engineering,
School of Pharmacology, Aichi Gakuin University,
1-100 Kusumoto-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8650, Japan

目 次

I. 緒 言	1
II. 材料および方法	2
1. 使用菌株	2
2. 光感受性物質	2
3. 半導体レーザー	2
4. 歯肉モデルの要件	2
5. 歯周ポケット外照射モデルにおける照射条件	2
6. 光感受性物質による透過エネルギーの吸収	2
7. 冷却法	3
8. 歯周ポケット外照射モデルによる aPDT (浮遊細菌)	3
9. 歯周ポケット外照射モデルによる aPDT (バイオフィルム)	3
10. 統計処理	4
III. 結 果	4
1. 歯肉モデルの決定	4
2. 歯周ポケット外照射モデルにおける照射条件の決定	4
3. 光感受性物質による透過エネルギーの吸収確認	4
4. 冷却法の決定	5
5. 歯周ポケット外照射モデルによる aPDT の効果 (浮遊細菌)	5
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)	6
IV. 考 察	6
V. ま と め	7
謝 辞	7
文 献	8

I. 緒 言

歯周炎は、歯面や歯周ポケットにバイオフィルムを形成する歯周病原細菌の感染により、宿主が過剰な免疫応答を起こし、結果的に歯周組織破壊をきたす慢性炎症性疾患である¹⁾。そのため、歯周病原細菌を殺菌及び除去することが、この疾患に対する主な治療法となる²⁾。非外科的療法であるスケーリング・ルートプレーニング（以下 SRP）は、スケーラー等の器具を用いて、機械的にプラークや歯石、感染セメント質、象牙質を除去する治療法で、歯周組織破壊に対し有意な改善効果を認めている。しかし、Matiaらが、根分岐部に対する非外科的療法において、37.7%の歯石の取り残しが認められたと報告しているように³⁾、器具の到達しにくい部位では、病原因子を完全に除去することは難しい。そのため、局所的薬物配送療法をはじめ、器具の到達しにくい部位に対する SRP の補助的療法が評価されてきている⁴⁻⁷⁾。レーザーによる殺菌及び歯石除去もその一つで、これまで多くの報告で有効性が示されている。しかし、欠点として、用いられるレーザーエネルギーが高出力のため、熱による歯髄及び歯周組織への悪影響が懸念されている⁸⁻¹⁰⁾。

近年、新たな補助的療法として、抗菌光線力学療法（以下 aPDT）が注目され始めている¹¹⁻¹⁴⁾。aPDTとは、光感受性物質に特定波長の低出力のレーザーを照射することにより、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、抗菌薬とは異なり、耐性菌にも効果があるとされている^{15, 16)}。これまで著者らの研究室では、光感受性物質として、キトサンコーティングを施した、インドシアニングリーン封入ナノ粒子（以下 ICG-Nano/c）を独自開発し、これに 810 nm 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¹⁷⁾。

歯周炎の一つである根分岐部病変は、歯根の形態が複雑であることや、骨の吸収が不均一であることから、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¹⁸⁾。一般的な aPDT では、光感受性物質を注入した歯周ポケットに照射プローブを挿入し、レーザーを照射するが、これを根分岐部病変に行くと、図 1A のように照射方向が制限されてしまう。根分岐部の病変全体に光を届かせることは困難であり、光感受性物質の一部しか励起させることができないため、十分な殺菌効果が得られないと考えられる。そこで著者らは、新たなレーザーの照射法として、図 1B の

ように歯周ポケット外から照射する方法を考察した。歯周ポケット外からレーザーを照射することにより、病変に様々な角度から光を当てることができるようになる。そのため、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、光を十分に届けることができ、根分岐部病変全体の光感受性物質を励起させることが可能になるという利点がある。

基盤論文参照

International Journal of Molecular Sciences 2017,18,154

図 1. 一般的な照射法と新規の照射法の比較

- A. 一般的な照射法（歯周ポケット内照射）。照射方向が制限されてしまうため、根分岐部のようなアクセスしにくい場所に光を十分に届けることができない。
- B. 新規の照射法（歯周ポケット外照射）。自由な方向で照射できるため、根分岐部のようなアクセスしにくい場所でも光を十分に届けることができる。

近赤外光（700-2500 nm）は、ほとんどの軟組織に対して高透過性であり、特に 700-1300 nm の波長の範囲は「生体の分光学的窓」と呼ばれ、組織深部まで透過することができる¹⁹⁻²¹⁾。また、650 nm 以下の波長では 3.0-3.5 mm 程度しか透過しないのに対し、近赤外光では 6 mm 程度透過できると報告されている²²⁾。著者らの研究室でこれまで用いてきた半導体レーザーの波長は 810 nm であり、生体の分光学的窓内にあるため、十分に歯周組織を透過すると考えられる。また、光感受性物質である ICG の吸収波長は、血漿タンパク中においては 805 nm で最大の吸収を示し、今回用いる半導体レーザーの 810 nm の波長に十分に反応すると考えられる²³⁾。加えて、この ICG と半導体レーザーの組み合わせは、医科では蛍光イメージングにも用いられており生体での安全性が確認されている²⁴⁾。

以上のことから、半導体レーザーを用いた歯周ポケット外照射による aPDT は可能であると仮定し、本研究では、将来的に臨床応用を見据え *in vitro* の歯周ポケット外照射モデルを作製し、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

被験菌体には歯周病原細菌の一つである *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 株を用いた。

P.gingivalis の継代には、馬血液寒天培地を用いて、37℃、嫌気条件下にて培養し、1週間ごとに新たな寒天培地に継代保存を行った。また、実験に用いる *P.gingivalis* の液体培養には、酵母エキス (1 mg/mL)、ヘミン (5 μg/mL)、メナジオン (1 μg/mL) を添加した trypticase soy broth (以下 sTSB, Becton, Dickinson & Co, Cockeysville, MD, USA) を使用し、37℃にて対数増殖期まで嫌気培養した。吸光度計 (波長 600 nm) を用いて、OD=0.1 (1 × 10⁸ CFU/mL) に調整した菌液を浮遊細菌サンプルとして使用した。また、上記の馬血液寒天培地を 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 (1 × 10⁸ CFU/mL) に調整した菌液を注入し、嫌気状態にて 2 日間培養したもの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^{17, 25, 26)}。すなわち、エマルジョン溶媒拡散法により、安全性の高い生体適合性高分子である乳酸グリコール酸共重合体を基剤にナノ粒子を作成し、これに ICG (オフサグリーン、参天製薬、大阪) を封入した。ICG 封入ナノ粒子 (以下 ICG-Nano) の封入率は 5 mg/g であった。

さらに、キトサンを ICG-Nano の表面を覆うポリマーとして使用し、キトサンコーティングを施した。凝集防止剤としてマンニトールを添加した。

ICG-Nano/c の使用濃度は 10 mg/mL であり、ナノ粒子中の ICG の濃度は 0.05 mg/mL であった。

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) は、中心波長 810 ± 20 nm、最大出力 3W、導光用ファイバーの先端径は 600 μm である。照射モードは、繰り返しパルス照射 (RPT) モード (デューティー比: 50%、パルス幅: 100 ms、ピーク出力: 0.5W-3W、4-24W/cm²) に設定し、照射距離 1 cm で、照射範囲は直径 2.8 mm である。

4. 歯肉モデルの要件

歯肉モデルの要件として、(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²⁷⁾、

(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、3 mm 厚にスライスした新鮮な牛肉、豚肉、鶏肉にレーザー照射し、パワーメーター (LASERSTAR, Ophir Optronics Solutions, Jerusalem, Israel) を用いて透過エネルギー (W) を測定した。これらのうち最も透過エネルギーが低いものを歯肉モデルとした (図 2)。

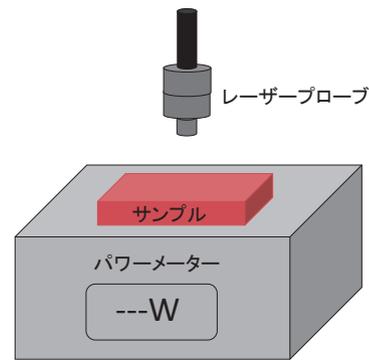


図 2. 歯肉モデルの要件 (実験図)

5. 歯周ポケット外照射モデルにおける照射条件

以前のポケット内照射を想定した、直接照射モデルを用いた研究で殺菌に必要とされたエネルギー (W) と、歯肉モデルを透過したエネルギー (W) が同等となる出力を、パワーメーターを用いて測定し検索した (図 3)。

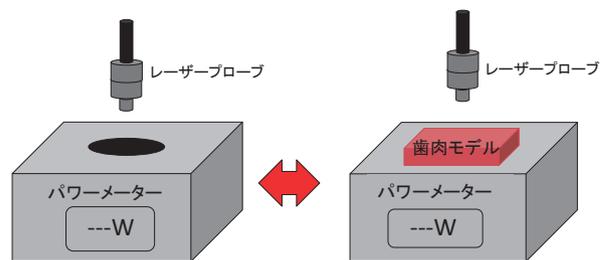


図 3. 歯周ポケット外照射モデルにおける照射条件 (実験図)

6. 光感受性物質による透過エネルギーの吸収

96 穴プレートに、ICG-Nano/c を加えた sTSB を 200 μL 入れ (最終濃度、10 mg/mL)、歯肉モデルをその上に設置した。その後、プレートをパワーメーター

の上に置き、その上方よりレーザーを照射し到達エネルギー (W) を測定した。ICG-Nano/c を加えない sTSB をコントロール群とした (図 4)。

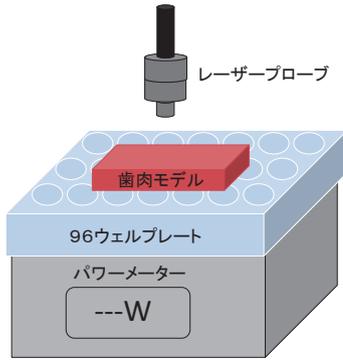


図 4. 光感受性物質による透過エネルギーの吸収 (実験図)

7. 冷却法

レーザーによる熱障害を回避する冷却法の検討のために 4 パターン (1) 連続照射、(2) 間欠照射、(3) 連続照射+エア冷却、(4) 間欠照射+エア冷却、を設定し歯肉モデルおよび ICG-Nano/c 溶液の温度上昇を比較した。間欠照射は、60 秒おきに 10 秒間の休止を行って照射した。エア冷却は、エアポンプを用いて、2L/秒のエアを歯肉モデル表面に送風し冷却した。熱測定は、0.2 mL チューブに ICG-Nano/c 溶液を入れ、その上に歯肉モデルをのせ、15 cm の距離からサーモグラフィ (開始温度 26°C、Tnermo GEAR G100、日本アビオニクス、東京) で測定した (図 5)。また測定範囲において温度が一番高い点を記録した。

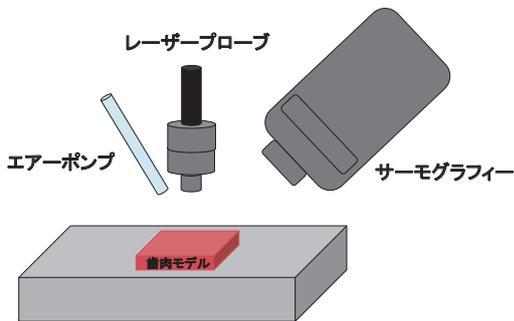


図 5. 冷却法 (実験図)

8. 歯周ポケット外照射モデルによる aPDT (浮遊細菌)

菌液 100 μ L と ICG-Nano/c を加えた培地 100 μ L を 0.2 mL チューブに入れ混和し、その後、チューブを歯肉モデルの下に位置づけ、歯肉モデル表面から 1 cm の位置からレーザーを照射した。レーザー照射後、 $10^{-4} \sim 10^{-7}$ まで段階希釈した菌液を、血液寒天培地に播種した。被検菌を播種した培地を 37°C、嫌気条件下にて 1 週間培養し、肉眼的にコロニー数をカウントし、希釈率を元に培地上の生菌数を求めた (図 6)。

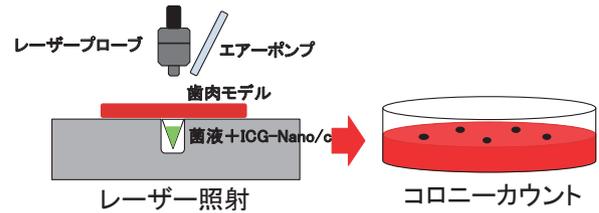


図 6. 歯周ポケット外照射モデルによる aPDT (浮遊細菌) (実験図)

9. 歯周ポケット外照射モデルによる aPDT (バイオフィルム)

血液寒天培地上に形成されたバイオフィルムを壊さないように注意して、浮遊細菌を含む菌液を全て、マイクロピペットで除去し、ICG-Nano/c を加えた培地 100 μ L を注入した。その後、96 穴ディーププレートで歯肉モデルの下に位置づけし、歯肉モデル表面の 1 cm 上方からレーザーを照射した。レーザー照射後、バイオフィルムを全量マイクロピペットで回収し、 $10^{-4} \sim 10^{-7}$ まで段階希釈した菌液を血液寒天培地に播種した。被検菌を播種した培地を 37°C、嫌気条件下にて 1 週間培養し、肉眼的にコロニー数をカウントし、希釈率を元に培地上の生菌数を求めた (図 7)。

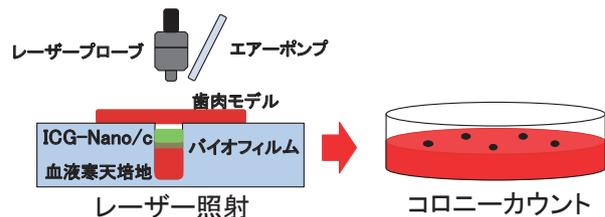


図 7. 歯周ポケット外照射モデルによる aPDT (バイオフィルム) (実験図)

10. 統計処理

分析には、統計ソフト SPSS ver15.0 (IBM, Armonk, NY, USA) を用いた。正規性の検討には *Shapiro-Wilk and Kolmogorov-Smirnov* 検定を用いた。その結果正規分布であったため、*Dunnett's* または *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

歯肉モデルを選択するため、3 種類 (牛肉、豚肉、鶏肉) の組織片にレーザーを照射し、透過エネルギーを測定した。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 (図 8)。よって歯肉モデルとしてレーザー光が最も透過しにくかった牛肉片を選択し、以降の実験に使用した。

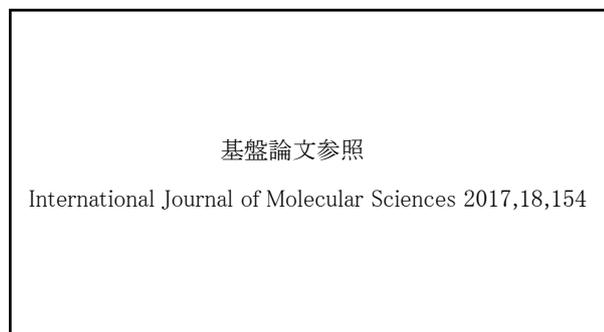


図 8. 歯肉モデルの選択

歯肉モデルの候補として、牛肉、豚肉、鶏肉にレーザー照射し、パワーメーターを用いて透過エネルギーを測定した。これらのうち最も透過エネルギーが低いものを歯肉モデルとした。データは平均±標準偏差を示す (n=3)。*: $p < 0.05$ (*Tukey* 検定)

2. 歯周ポケット外照射モデルにおける照射条件の決定

歯周ポケット外照射モデルの照射出力については、歯周ポケット内照射モデルによる aPDT の殺菌効果と同等の殺菌効果が得られる出力を設定しなければならない。歯周ポケット内照射モデルにおける *P.gingivalis* の抑制実験において、照射出力 0.7W (デューティー比:50%、パルス幅:100 ms) のときに、菌数の $2 \log_{10}$ 減少を確認している¹⁷⁾。この照射出力における実効エネルギーは、パワーメーターで測定すると 0.37W であるため、歯肉モデルを透過した実効エネルギーが同等となる (有意差を示さない) 照射出力を調べたところ、2W (デューティー比:50%、パルス幅:100 ms) のときに有意差を示さなかった ($p > 0.05$)。その

ためこの出力を歯周ポケット外照射出力と決定した (図 9)。

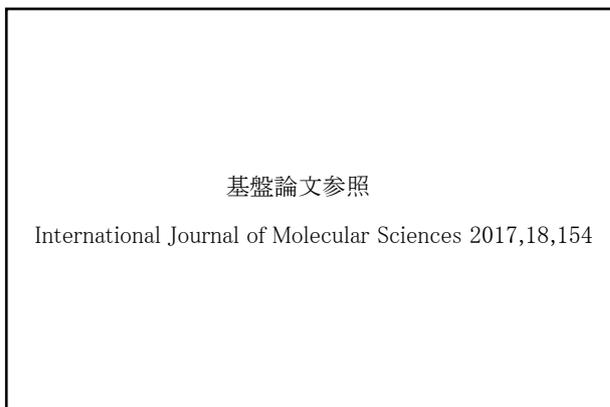


図 9. 歯周ポケット外照射における照射条件の設定

以前のポケット内照射を想定した、直接照射モデルを用いた研究で殺菌に必要とされたエネルギー (白カラム) と、歯肉モデルを透過したエネルギー (黒カラム) が同等となる (有意差を示さない) 照射出力を、パワーメーターを用いて測定し検索した。データは平均±標準偏差を示す (n=3)。*: $p < 0.05$, vs. count (*Dunnett's* 検定)

3. 光感受性物質による透過エネルギーの吸収確認

aPDT の機序として、光エネルギーを光感受性物質が吸収することによって、光感受性物質が励起され、ROS が発生する。歯肉モデルを透過したエネルギーが、ICG-Nano/c を励起させるかどうかを間接的に確認するために、ICG-Nano/c による透過エネルギーの減弱を確認した (図 10)。その結果、コントロール群と比較して、ICG-Nano/c 群は、透過エネルギーの減弱が有意に認められた ($p < 0.05$)。この結果より、歯肉モデルを透過したエネルギーが ICG-Nano/c に吸収され、ICG-Nano/c が励起されている可能性が示唆された。

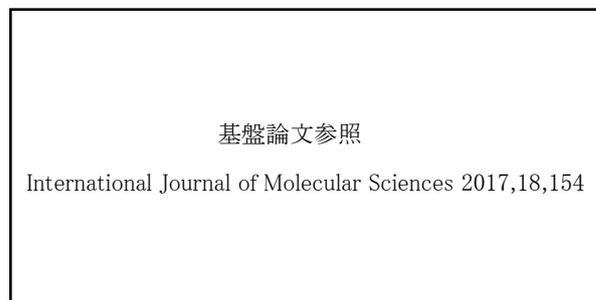


図 10. 光感受性物質による透過エネルギーの吸収確認

ICG-Nano/c を加えた培地を ICG-Nano/c 群とし、ICG-Nano/c を加えない培地をコントロール群とした。データは平均±標準偏差を示す (n=3)。*: $p < 0.05$ (*T* 検定)

4. 冷却法の決定

歯周ポケット外照射の場合、歯周ポケット内照射と比較して照射エネルギーが高くなるため、歯肉組織の熱障害の回避が最も重要となる。図 11 に、歯周ポケット外照射モデルに対し 4 パターンの冷却法を比較した結果を示す。歯肉モデル表面の温度上昇が最も高かったのは、連続照射群 (+ 15.27°C、5 分経過時) で、最も低かったのは間欠照射+エア冷却群 (+ 2.72°C、5 分経過時) であった (図 11A)。また、ICG-Nano/c 溶液でも同様に、最も温度上昇が低かったのは、間欠照射+エア冷却群 (+ 4.94°C、5 分経過時) であった (図 11B)。



基盤論文参照

International Journal of Molecular Sciences 2017,18,154

図 11. 冷却法の違いによる温度上昇の比較

A. 歯肉モデル表面の温度上昇。B. ICG-Nano/c 温度上昇。間欠照射は、60 秒おきに 10 秒間の休止を行って照射した。エア冷却は、エアポンプを用いて、2L/秒のエアを歯肉モデル表面に送風し冷却した。測定範囲において温度が一番高い点を記録した (n=3)。

5. 歯周ポケット外照射モデルによる aPDT の効果 (浮遊細菌)

歯周ポケット外照射の有効性を示す第一段階の実験として、まず浮遊細菌に対する殺菌効果を確認した。ここまでの実験の結果から導いた最適な設定 (歯肉モデル: 3 mm 厚の牛肉片、照射出力: 2W、デューティー

比: 50%、パルス幅: 100 ms、冷却法: 間欠照射+エア) を使用して実験を行った。図 12 に、歯周ポケット外照射モデルによる殺菌効果を CFU で確認した結果 (\log_{10} CFU) を示す。生菌数は、コントロール群で 6.93 ± 0.07 、1 分間照射群で 6.27 ± 0.06 、3 分間照射群で 5.44 ± 0.28 、5 分間照射群で 2.77 ± 0.39 であった (図 12A)。コントロール群と比較して、aPDT 群のどの照射時間においても有意な菌数の減少を示した ($p < 0.05$)。また、最も菌数が減少したのは、5 分間照射群で $4.15 \log_{10}$ (99.99%) の減少、次に 3 分間照射群で $1.48 \log_{10}$ (96.7%) の減少、1 分間照射群で $0.66 \log_{10}$ (78.1%) の減少であった。以前に著者らの研究室で報告した歯周ポケット内照射の殺菌効果は



基盤論文参照

International Journal of Molecular Sciences 2017,18,154

図 12. 歯周ポケット外照射による aPDT の殺菌効果 (浮遊細菌)

A. 照射時間による殺菌効果の違い。ICG-Nano/c を用いた aPDT 群 (黒カラム) では、レーザー照射時間を 1、3、5 分とし、ICG-Nano/c を用いないコントロール (白カラム) と殺菌効果を比較した。B. aPDT 作用の確認。レーザー照射および ICG-Nano/c を加えない物をコントロール群、ICG-Nano/c 単独の物を ICG-Nano/c 群、レーザー照射単独の物をレーザー照射群、レーザー照射および ICG-Nano/c を加える物を aPDT 群とした。データは平均±標準偏差を示す (n=3)。*: $p < 0.05$ (Tukey 検定)

2 log₁₀ 減少であったため、3 分間照射で最も近い結果となると考えられた¹⁷⁾。上述の殺菌効果が、aPDT によるものであるかを確認するため、ICG-Nano/c 単独の群 (ICG-Nano/c 群) と、レーザー照射単独の群 (レーザー群) を追加して、実験を行った (図 12B)。その結果、生菌数 (log₁₀CFU) はコントロール群で 8.04 ± 0.03、ICG-Nano/c 群で 8.12 ± 0.05、レーザー群で 8.00 ± 0.09、aPDT 群で 5.94 ± 0.51 であった。どの群と比較しても aPDT 群において、有意な菌数の減少を認めた。また、コントロール群との比較においては 2.10 log₁₀ (99.2%) の減少を認めた (*p* < 0.05)。

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)

次に歯周病原細菌は浮遊細菌だけではなく、バイオフィルムとしても存在するため、今後の臨床応用を考慮する上で、バイオフィルムに対する効果について検討する必要がある。図 13 に、歯周ポケット外照射モデルによる殺菌効果を CFU で確認した結果を示す。生菌数 (log₁₀CFU) は、コントロール群で 7.42 ± 0.1、ICG-Nano/c 群で 7.48 ± 0.08、レーザー群で 7.15 ± 0.03、aPDT 群で 6.23 ± 0.13 であった。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 log₁₀ (93.5%) の減少を認めた (*p* < 0.05)。

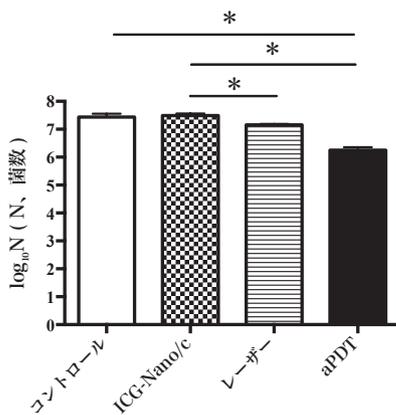


図 13. 歯周ポケット外照射による aPDT の殺菌効果 (バイオフィルム)

レーザー照射及び ICG-Nano/c を加えないものをコントロール群、ICG-Nano/c 単独のものを ICG-Nano/c 群、レーザー照射単独のものをレーザー群、レーザー照射および ICG-Nano/c を加えるものを aPDT 群とした。データは平均 ± 標準偏差を示す (n=3)。* : *p* < 0.05 (Tukey 検定)

IV. 考 察

歯肉表面から歯周組織にレーザー照射を行う研究では、創傷や病変の治癒促進に焦点を当てた報告がほとんどである²⁸⁾。著者らは基盤論文にて、初めて歯周ポケット外からレーザー照射を想定した aPDT の研究を報告した。半導体レーザーの生体組織への透過性に着目した時、歯周ポケット外からのレーザー照射でも、歯肉を透過したエネルギーが、光感受性物質を励起させることによって ROS が発生し、殺菌することができると考えられた。この照射法が従来の照射法と比較して優れている点としては、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く、また、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、従来の方法での問題点を大きく改善できると予測される。

今回の研究にあたり、まず最初に考慮すべきは、歯肉モデルの選択であった。ヘモグロビン、酸化ヘモグロビン、ビリルビン等の血液由来色素は、皮膚組織において、最も光吸収に関与していると言われている²²⁾。しかし、生体から歯肉サンプルを摘出する場合、血液供給が途絶えてしまうため、生体レベルの血液由来色素を維持することは不可能だと考えられる。ミオグロビンはプロトヘムを含むヘムタンパク質で、ヘモグロビンに類似した吸光波長を持つ。よって著者らは、ミオグロビンが常に安定して停滞している筋組織を歯肉モデルとした。実験結果より、牛肉が他の異なる筋組織と比較して、最もレーザー光が透過しにくいということが判明したため、牛肉を透過できるエネルギーならば、実際の歯肉に置き換えた場合も十分にエネルギーが透過できるのではないかと考えた。また今回、照射出力 2W の時、歯肉モデルを透過したエネルギーが 0.37W となり、透過率は約 25% であった。Anders らは、810 nm の波長の光の透過率を測定した場合、ラットの腓腹筋では 7.42%、皮膚では 24.63%²⁹⁾ であったとしており、今回の結果と概ね一致している。

今回の実験結果では、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 (200-500 mW)^{12, 30)} 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。そこで、エア冷却を行いながら、間欠的に照射することによって、このリスクを回避できないか検討したところ組織の温度上昇を 3℃未満に抑えることができた。これまで 5℃の温度上昇でも可逆性変化が生じ、

20℃以上の温度上昇でタンパク変性が生じるという報告があり³¹⁾この照射法による温度上昇の影響はほぼないと考えられる。

歯肉モデルを透過したエネルギーが殺菌効果を示すためには、光感受性物質を励起させ ROS を生じる必要がある。しかし、ROS は存在時間が短く (1×10^{-6} s)、直接測定することは技術的に難しいため、光感受性物質が励起する際にエネルギーを吸収する現象を利用して、間接的に確認した。その結果、歯肉モデルを透過したエネルギーは ICG-Nano/c に吸収され ROS を発生させると考えられた。この結果は生体組織を透過させてもレーザー光のコヒーレンスは変化しないという Fixler らの報告からも推察された³²⁾。

歯周ポケット外照射の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、以前著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¹⁷⁾。また ICG を使用した aPDT で *Staphylococcus aureus* と *Pseudomonas aeruginosa* に対して最大で $2 \log_{10}$ の殺菌効果を示したという報告と比べても、歯周ポケット外照射は ICG による最大限の殺菌効果を示すと考えられた¹⁵⁾。また、バイオフィルムの状態に培養した *P. gingivalis* に対しても同様の実験を行った。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ておく必要がある。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とから、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。浮遊細菌に対する実験との結果の差異は、バイオフィルムの構造に起因すると思われる。バイオフィルムは、微小な細菌の集塊であるマイクロコロニーが層状に積み重なった構造を呈しており、それぞれのマイクロコロニーの細菌の集積密度によっては、ICG-Nano/c が均一に分布していない可能性があり、浮遊細菌に対するほどの殺菌効果に至らなかったと考えられる。ICG 以外の光感受性物質を用いた aPDT では、メチレンブルーと 670 nm の波長のレーザーを用いた実験で、*P. gingivalis* の浮遊細菌に対して $7 \log_{10}$ 、バイオフィルムに対しては $4.5 \log_{10}$ の減少を示したという報告³³⁾があるが、670 nm の波長は 810 nm の波長よりも、組織透過性が低く、歯周ポケット外照射では殺菌効果が低下すると思われる。

ICG はその他の光感受性物質よりも熱を発する性質

を持つため、温熱療法に用いられており^{34, 35)}、温度上昇に伴って殺菌効果も増強している可能性がある。Kranz らは高濃度の ICG を含む菌液に近赤外光を照射した場合、温度が 60℃以上に上昇し殺菌効果が生じたと報告している。この報告によって彼らは、ICG の濃度によって熱産生量に変化していることを示唆している³⁰⁾。今回の研究では、ICG-Nano/c 溶液の温度上昇は 5℃未満であったため、温度上昇による殺菌効果よりも、ROS による殺菌効果が主たる作用であったと考えられる。しかしながら、サーモグラフィーによる測定には限界があり、最短で 16 ミリ秒ごとの測定、最小範囲は $270 \times 270 \mu\text{m}$ であるため、もし限界以上の速さや、限界以下の範囲での大きな温度変化があった場合は測定が困難となる。従って、温度上昇による殺菌効果も完全には否定することはできないが、組織が影響を受けずに殺菌効果が相加的に向上するのであれば、むしろ望ましい効果と言える。

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 810 nm 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。

謝辞 稿を終えるにあたり、本研究の御指導と御校閲を賜りました愛知学院大学歯学部附属病院口臭治療科 福田光男特殊診療科教授ならびに愛知学院大学歯学部歯周病学講座 三谷章雄教授に深甚なる謝辞を表します。また、日頃から格別なる御指導と御校閲を賜りました愛知学院大学歯学部歯周病学講座 林潤一郎講師に深謝致します。

本研究の遂行に対し、適切な御教示と御助言を賜りました愛知学院大学薬学部製剤学講座 山本浩充教授に深謝申し上げます。

最後に、本研究にご理解とご協力を頂きました愛知学院大学歯学部歯周病学講座、愛知学院大学歯学部附属病院口臭治療科の諸先生各位に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Chaves ES, Jeffcoat MK, Ryerson CC, Snyder B: Persistent bacterial colonization of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in periodontitis and its association with alveolar bone loss after 6 months of therapy. J Clin Periodontol, **27**(12) : 897-903, 2000.
- 2) Cobb CM: Clinical significance of non-surgical periodontal therapy: an evidence-based perspective of scaling and root planing. J Clin Periodontol, **29**(s2) : 22-32, 2002.
- 3) Matia JI, Bissada NF, Maybury JE, Ricchetti P: Efficiency of scaling of the molar furcation area with and without surgical access. Int J Periodontics Restor Dent, **6**(6) : 24-35, 1986.
- 4) Preus HR, Mjoen E, Romstad E, Gjermo P: Are topically delivered antibiotics beneficial as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of periodontal diseases? A systematic review. Periodontal Pract Today, **4**(1):31-36, 2007.
- 5) Lu HK, Chei CJ: Efficacy of subgingivally applied minocycline in the treatment of chronic periodontitis. J Periodontal Res, **40**(1) : 20-27, 2005.
- 6) Hanes PJ, Purvis JP: Local anti-infective therapy: pharmacological agents. A systematic review. Ann Periodontol, **8**(1) : 79-98, 2003.
- 7) Greenstein G: Local drug delivery in the treatment of periodontal diseases: assessing the clinical significance of the results. J Periodontol, **77**(4) : 565-578, 2006.
- 8) Giannelli M, Bani D, Viti C, Tani A, Lorenzini L, Zecchi-Orlandini S, Formigli L: Comparative evaluation of the effects of different photoablative laser irradiation protocols on the gingiva of periodontopathic patients. Photomed Laser Surg, **30**(4) : 222-230, 2012.
- 9) Miyazaki A, Yamaguchi T, Nishikata J, Okuda K, Suda S, Orima K, Kobayashi T, Yamazaki K, Yoshikawa E, Yoshie H: Effects of Nd:YAG and CO₂ laser treatment and ultrasonic scaling on periodontal pockets of chronic periodontitis patients. J Periodontol, **74**(2) : 175-180, 2003.
- 10) Seltzer S, Bender IB. The dental pulp: biologic considerations in dental procedures: Lippincott Williams & Wilkins; 1984.
- 11) Sgolastra F, Petrucci A, Severino M, Graziani F, Gatto R, Monaco A: Adjunctive photodynamic therapy to non-surgical treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. J Clin Periodontol, **40**(5) : 514-526, 2013.
- 12) Monzavi A, Chinipardaz Z, Mousavi M, Fekrazad R, Moslemi N, Azaripour A, Bagherpasand O, Chiniforush N: Antimicrobial photodynamic therapy using diode laser activated indocyanine green as an adjunct in the treatment of chronic periodontitis: A randomized clinical trial. Photodiagn Photodyn Ther, **14** : 93-97, 2016.
- 13) Braun A, Dehn C, Krause F, Jepsen S: Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. J Clin Periodontol, **35**(10) : 877-884, 2008.
- 14) Kikuchi T, Mogi M, Okabe I, Okada K, Goto H, Sasaki Y, Fujimura T, Fukuda M, Mitani A: Adjunctive application of antimicrobial photodynamic therapy in nonsurgical periodontal treatment: A review of literature. Int J Mol Sci, **16**(10) : 24111-24126, 2015.
- 15) Topaloglu N, Gulsoy M, Yuksel S: Antimicrobial photodynamic therapy of resistant bacterial strains by indocyanine green and 809-nm diode laser. Photomed Laser Surg, **31**(4) : 155-162, 2013.
- 16) Cieplik F, Tabenski L, Buchalla W, Maisch T: Antimicrobial photodynamic therapy for inactivation of biofilms formed by oral key pathogens. Front Microbiol, **5** : 405, 2014.
- 17) Nagahara A, Mitani A, Fukuda M, Yamamoto H, Tahara K, Morita I, Ting CC, Watanabe T, Fujimura T, Osawa K, Sato S, Takahashi S, Iwamura Y, Kuroyanagi T, Kawashima Y, Noguchi T: Antimicrobial photodynamic therapy using a diode laser with a potential new photosensitizer, indocyanine green-loaded nanospheres, may be effective for the clearance of *Porphyromonas gingivalis*. J Periodontal Res, **48**(5) : 591-599, 2013.
- 18) Svardstrom G, Wennstrom JL: Furcation topography of the maxillary and mandibular first molars. J Clin Periodontol, **15**(5) : 271-275, 1988.
- 19) Tsai C-L, Chen J-C, Wang W-J: Near-infrared absorption property of biological soft tissue constituents. J Med Biol Eng, **21**(1) : 7-14, 2001.
- 20) Anderson RR, Parrish JA: The optics of human skin. J Invest Dermatol, **77**(1) : 13-19, 1981.
- 21) Wilson BC, Jacques SL: Optical reflectance and transmittance of tissues: principles and applications. IEEE J Quantum Electron, **26**(12) : 2186-2199, 1990.
- 22) Bashkatov AN, Genina EA, Kochubey VI, Tuchin VV: Optical properties of human skin, subcutaneous and mucous tissues in the wavelength range from 400 to

- 2000 nm. *J Phys D Appl Phys*, **38**(15) : 2543–2555, 2005.
- 23) Sawa M, Awazu K, Takahashi T, Sakaguchi H, Horiike H, Ohji M, Tano Y : Application of femtosecond ultrashort pulse laser to photodynamic therapy mediated by indocyanine green. *Br J Ophthalmol*, **88**(6) : 826–831, 2004.
- 24) Yuan A, Wu J, Tang X, Zhao L, Xu F, Hu Y : Application of near-infrared dyes for tumor imaging, photothermal, and photodynamic therapies. *J Pharm Sci*, **102**(1) : 6–28, 2013.
- 25) Fujimura T, Mitani A, Fukuda M, Mogi M, Osawa K, Takahashi S, Aino M, Iwamura Y, Miyajima S, Yamamoto H : Irradiation with a low-level diode laser induces the developmental endothelial locus-1 gene and reduces proinflammatory cytokines in epithelial cells. *Lasers Med Sci*, **29**(3) : 987–994, 2014.
- 26) Yamamoto H, Kuno Y, Sugimoto S, Takeuchi H, Kawashima Y : Surface-modified PLGA nanosphere with chitosan improved pulmonary delivery of calcitonin by mucoadhesion and opening of the intercellular tight junctions. *J Control Release*, **102**(2) : 373–381, 2005.
- 27) Goasind G, Robertson P, Mahan C, Morrison W, Olson J : Thickness of facial gingiva. *J Periodontol*, **48**(12) : 768–771, 1977.
- 28) Aykol G, Baser U, Maden I, Kazak Z, Onan U, Tanrikulu-Kucuk S, Ademoglu E, Issever H, Yalcin F : The effect of low-level laser therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment. *J Periodontol*, **82**(3) : 481–488, 2011.
- 29) Anders JJ, Wu X : Comparison of light penetration of continuous wave 810 nm and superpulsed 904 nm wavelength light in anesthetized rats. *Photomed Laser Surg*, **34**(9) : 418–424, 2016.
- 30) Kranz S, Huebsch M, Guellmar A, Voelpel A, Tonndorf-Martini S, Sigusch BW : Antibacterial photodynamic treatment of periodontopathogenic bacteria with indocyanine green and near-infrared laser light enhanced by Trolox (TM). *Lasers Surg Med*, **47**(4) : 350–360, 2015.
- 31) Niemz MH. *Laser-tissue interactions: fundamentals and applications* : Springer Science & Business Media; 2013.
- 32) Fixler D, Duadi H, Ankri R, Zalevsky Z : Determination of coherence length in biological tissues. *Lasers Surg Med*, **43**(4) : 339–343, 2011.
- 33) Street CN, Pedigo LA, Loebel NG: Energy dose parameters affect antimicrobial photodynamic therapy-mediated eradication of periopathogenic biofilm and planktonic cultures. *Photomed Laser Surg*, **28** Suppl **1** : S61–66, 2010.
- 34) Topaloglu N, Güney M, Yuksel S, Gülsoy M : Antibacterial photodynamic therapy with 808-nm laser and indocyanine green on abrasion wound models. *J biomed opt*, **20**(2) : 028003–028003, 2015.
- 35) Hirohashi K, Anayama T, Wada H, Nakajima T, Kato T, Keshavjee S, Orihashi K, Yasufuku K : Photothermal ablation of human lung cancer by low-power near-infrared laser and topical injection of indocyanine green. *J bronchol int pulmonol*, **22**(2) : 99–106, 2015.

論文提出先：愛知学院大学大学院歯学研究科委員会
(名古屋市千種区楠元町 1-100)

