

論 文 内 容 要 旨

Antimicrobial photodynamic therapy using a plaque disclosing
solution on *Streptococcus mutans*

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

口腔科学講座 小椋 有香子

(指 導： 吉野文彦 准教授)

論文内容要旨

う蝕は最も一般的な乳歯や幼若永久歯で見られる疾患であり、う蝕予防を目的とし歯科臨床ではシーラント処置が行われてきている。しかし、前処置として小窩裂溝など微細構造を構成する部位におけるバイオフィーム除去を完全に達成することは困難である。したがって、歯科機器で除去困難部位における微生物無効化の方法確立の必要性がある。

近年、光線力学療法は様々な疾患へ適応されてきている。とくに、光不活性化なグラム陰性・陽性菌に対する PDT は抗菌光線力学療法 (aPDT) と呼ばれ、歯科領域でも *in vitro* や *in vivo* の研究データが示されてきている。しかし、これら aPDT の主たる標的は歯周病原菌であり、う蝕病原菌である *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) に対する aPDT の検討は少ない。また、aPDT の詳細な殺菌メカニズムの報告はほとんど見られない。このような背景から、本研究は *S. mutans* に対し歯垢染色剤として広く使用される Phloxine B (PhB) を光増感剤に用い、レジン重合に使用される青色 LED 照射 (BLI) の aPDT 効果について検討を行った。

はじめに、PhB の吸収波長スペクトルを検討した結果、540 nm をピークに、450~570 nm に吸収波長スペクトルを認めた。よって本研究で使用した 475 nm のピーク波長を有する SCOPELED は、PhB を十分に光励起する可能性が確認できた。続いて、X-band 電子スピン共鳴法による検討により PhB に対する BLI で生成される活性酸素種 (ROS) の測定を行った。その結果、BLI は PhB を光励起させ一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) を生成することを認めた。さらに、 $^1\text{O}_2$ は特異的消去剤の L-histidine 添加で有意に消去され ($p < 0.001$)、生成量は照射強度および色素濃度依存的に増加した。さらに、PhB 処理による BLI の aPDT 効果を実証するため、*S. mutans* に対する発育抑制効果を Colony Forming Unit (CFU) 測定により検討した。10 J BLI 単独および PhB 単独処置では CFU に変化を認めなかったが、BLI + PhB 処置では CFU の有意な低下を認めた ($p < 0.0001$)。また、詳細な殺菌メカニズム検討のため、 $^1\text{O}_2$ や他の ROS による酸化ストレス障害で生じるカルボニル化タンパク (PC) の測定を行った。その結果、BLI + PhB 処置により *S. mutans* に PC の有意な増加が認められた。

$^1\text{O}_2$ は、細胞膜や DNA に対して非常に強力な酸化力を発揮することで知られる ROS である。光破壊的な酸化バーストは、光増感剤の局在部位で近接して起こることが報告されている。しかしながら、光増感剤による細胞の光不活性化は生成した $^1\text{O}_2$ が細胞に存在する脂質、核酸等の生体分子を酸化することで細胞死に至ると考えられている。今回 PC の増加が認められたことから aPDT により *S. mutans* 周辺で一重項酸素が生成され、酸化障害を生じることで *S. mutans* に対して殺菌的に作用した可能性を示唆している。これまで、グラム陽性菌はグラム陰性菌と比較し、細胞壁がより低い複雑性であるためより aPDT の影響を受けやすいことが報告されている。PhB やローズベンガルなどのキサントゲン系色素は、グラム陽性菌である *Streptococcus aureus* の細胞質膜へ取り込まれ光照射により $^1\text{O}_2$ を生成することで、細胞膜に存在する生体分子に損傷を与え、細菌を不活性化することを報告されている。これらのことから、*S. mutans* のどの器官に $^1\text{O}_2$ による酸化的障害が生じたかは不明であるが、細胞膜への酸化障害が aPDT の作用メカニズムであるかもしれない可能性が示唆された。本研究の最終目標は、シーラントによるう蝕予防処置の際、除去困難な小窩裂溝に存在する *S. mutans* の殺菌である。PhB は小窩裂溝幅より小さい分子であり、裂孔深部のバイオフィームも染色可能である。さらに、超音波とは異なり、裂孔深部まで光の浸透は十分可能であることが考えられる。したがって、本研究結果は aPDT をシーラント前処置として用いることで、歯垢染色液で染まっているが、実質除去不可能な場所のバイオフィームに存在するう蝕病原菌の殺菌を可能にする可能性が示唆された。