

歯垢染色液色素を応用した新規歯周病治療法の基礎的解析

吉田 彩佳

神奈川歯科大学総合歯学教育学講座歯学教育学分野・准教授

Basic study of a new periodontal treatment using plaque disclosing solution dye

Ayaka YOSHIDA

Department of Dental Education Kanagawa Dental University

Abstract

In recent years, expectations for antibacterial photodynamic therapy (aPDT) have increased due to the spread of antimicrobial resistance (AMR) microorganisms. Antibiotics, one of the antimicrobial therapies, have a specific point of action on the structure or metabolic pathway of microorganisms and show bactericidal or bacteriostatic effects. AMR microorganisms have acquired resistance to the point of action of antibiotics in order to nullify them. On the other hand, aPDT causes oxidative damage to the structure and/or metabolic pathway of microorganisms by photoexcitation of photosensitizers, and exhibits bactericidal activity. This action has no specific point of action, and aPDT-induced reactive oxygen species (ROS) affect the structure and/or metabolic mechanism of microorganisms. Therefore, aPDT is attracting attention as a new strategy for antimicrobial therapy.

In this study, we proposed the possibility of applying products used in clinical dentistry to this aPDT. We investigated the mechanism and bactericidal effect of aPDT on the periodontopathogenic bacterium *Porphyromonas gingivalis* (*P.g*) using blue light from a visible-light dental curing light and Rose Bengal (RB), a plaque disclosing solution. We confirmed that singlet oxygen, one of ROS, is generated by photoexcitation of RB with blue light. By irradiating RB-stained *P.g* with blue light, we confirmed carbonylation, which is one of the protein oxidative stress, and confirmed suppression of proliferative activity. These results suggest that the possibility of sterilization and this method may be a new treatment method for periodontal disease against AMR, which has become a problem in recent years.

1. 抗菌光線力学療法の現状

ペニシリンが1928年に発見・応用されるようになってから1年以内に耐性菌が出現した。抗菌薬は微生物感染症に対する化学療法の特長を維持するため、慎重な使用が必須にも関わらず抗菌薬の誤った処方や過剰使用が起因となる多剤耐性微生物の蔓延を引き起こし、近年の公衆衛生に対する最も憂慮すべき脅威のひとつである¹⁻³⁾。

抗菌光線力学療法 (antimicrobial photodynamic therapy; aPDT) は抗菌目的の治療法として20世紀

初頭にすでに研究されていた。しかしながら最近まで抗生物質の台頭により aPDT は感染症分野での発展に至らなかった。一方、一部の癌や加齢黄斑変性症の治療など PDT は現在日常的な臨床現場ですでに治療方法として使用されており、日本でも癌治療に対する保険収載、眼科治療におけるガイドラインの制定がなされている⁴⁻⁸⁾。臨床現場での PDT の有用な結果を築き上げてきたこと、また、薬剤耐性 (AMR) 微生物の蔓延に伴う新たな抗菌療法の切実なニーズにより、aPDT は近年再び脚光を浴びている⁹⁻¹²⁾。

PDT は光増感物質に可視光線を照射し、光励起することで反応性三重項状態を誘導し、周囲の酸素分子から活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) を生成させる。ROS は、ヒドロキシルラジカル (HO) などのフリーラジカルに代表されるタイプ I の光化学メカニズムによる生成と、一重項酸素 (1O_2) にみられるタイプ II の光化学メカニズムによる生成に分類され、これら ROS は微生物を直接的に破壊することができる。タイプ I とタイプ II の反応は両方同時に起こる可能性があり、これらの反応比率は、使用する光増感物質の種類や分子の微小環境に依存する^{13,14)}。ROS は微生物の各細胞構造や異なる代謝経路に影響するため、aPDT に対する耐性が発現する可能性は低いと考えられる。このため光増感物質の頻繁な利用においても耐性菌の出現を誘導しないと考えられ、先に述べた AMR 微生物に対して aPDT は有効であるとされている³⁾。

歯科においては、1990 年代初頭に、歯周炎患者にメチレンブルー (MB) の酸化還元特性を利用する試みがなされた^{15,16)}。その後、光増感作用を利用した歯周病の微生物殺菌に利用されるようになった。これらに用いられる光増感物質は、トルイジンブルー O や MB などの青色色素が主流であり、これに反応する光源として 630 nm 以上の赤色光が主に用いられている¹⁷⁻²⁰⁾。しかしながら、これらの研究報告を臨床に応用するにはまだ検討の余地があり、現在に至るまで一般臨床現場での日常的な使用はない¹⁰⁾。

2. 青色光を用いた光線力学療法

青色光は血液やメラニン色素などに吸収されるため、前項における PDT 癌治療では主に赤色光が用いられている。一方、皮膚科領域においては露出した患部に光を照射するため、このような弊害はない。したがって皮膚疾患においては青色光を用いた臨床研究がすでになされている²¹⁻²⁴⁾。その代表的な方法は光感受性物質としてポルフィリン前駆物質の 5-aminolevulinic acid (ALA) を用い、この ALA が体内でポルフィリン代謝系を経てミトコンドリア内で青色光にも光感受性を示す内因性プロトポルフィリン IX (PpIX) として蓄積されることを応用し PDT を行う方法である^{25,26)}。

歯科において青色光は、光重合型コンポジットレジンの開発と使用が開始してから現在に至るまで歯科臨床には欠かせない光源となっている²⁷⁻³⁰⁾。しかしながら、PDT の癌治療や aPDT などの研究はほとんどなされておらず、歯牙漂白におけるオフィスブリーチに応用されるにとどまっている^{31,32)}。

われわれの研究室では、2010 年より歯科で頻用さ

れる青色光にターゲットを絞り研究を行ってきた。研究開始当初は眼科領域で青色光の弊害による加齢黄斑変性症などが話題となってきていたこともあり、生体・口腔組織に対する青色光の影響について研究を行っていた。この研究により、青色光照射が口腔内で酸化ストレスを誘導すること、この酸化ストレスは抗酸化物質で防御可能であることが見いだされた³³⁻³⁶⁾。歯科臨床において、青色光は使用不可にはできない機材であることから、これまでの研究結果を踏まえた上で有効活用できないかを模索し、aPDT への応用を草案した。われわれはこれまで、歯科の二大疾患の原因菌に関し、青色光による aPDT として代表的な歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* (*P.g*) の内因性色素である PpIX を光励起し、*P.g* の DNA に酸化障害を引き起こし殺菌できる可能性や、う蝕原因細菌である *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) を歯垢染色液色素のひとつであるフロキシシン B を用いて染色後、青色光で励起し *S. mutans* のタンパク質の酸化障害と増殖活性の抑制が確認され殺菌できる可能性を見出してきた^{37,38)}。

3. 歯垢染色液色素を用いた *Porphyromonas gingivalis* に対する抗菌光線力学療法

これまでわれわれが研究してきた青色光を応用した aPDT の知見を踏まえ、今回、歯垢染色液色素のひとつであるローズベンガル (RB) が、光励起で ROS 産生を引き起こす光増感色素であることに着目し、*P.g* を RB で染色し、青色光照射により引き起こされる殺菌メカニズムを検討した。青色光を 0.001% RB に照射することにより、ROS の一種である一重項酸素が検出された ($p < 0.0001$)。色素染色後 *P.g* の青色光照射は非照射群、色素染色単独群および青色光照射単独群と比較し有意に生存率が抑制 ($p < 0.01$) され、タンパク質の酸化障害であるカルボニル化タンパクが検出された。本結果は、*P.g* を歯垢染色色素 RB で染色し青色光照射により一重項酸素が生成され、*P.g* に存在するタンパク質の酸化ストレス障害による増殖活性抑制を示唆した。抗菌薬使用と比較し aPDT は通常耐性菌は極めて発生しにくいと考えられる。これらの結果は近年問題となってきている AMR に対し本法は新たな歯周病治療法となりうる可能性を示唆している。

謝 辞

本研究の一部は、神奈川県歯科大学学会平成 32 年度宿題報告研究費により遂行された。

1. Fotinos N, Convert M, Piffaretti JC, Gurny R, Lange

- N: Effects on gram-negative and gram-positive bacteria mediated by 5-aminolevulinic Acid and 5-aminolevulinic acid derivatives. *Antimicrob Agents Chemother.* **52**(4): 1366-73, 2008.
2. McBain A, Gilbert P: Biocide tolerance and the harbingers of doom. *International biodeterioration & biodegradation.* **47**(2): 55-61, 2001.
 3. Wainwright M, Crossley KB: Photosensitising agents—circumventing resistance and breaking down biofilms: a review. *International biodeterioration & biodegradation.* **53**(2): 119-26, 2004.
 4. Tano Y: Guidelines for PDT in Japan. *Ophthalmology.* **115**(3): 585. e6, 2008.
 5. Barnes R, Gee L, Taylor S, Briggs M, Harding S: Outcomes in verteporfin photodynamic therapy for choroidal neovascularisation—'beyond the TAP study'. *Eye.* **18**(8), 2004.
 6. Brown SB, Brown EA, Walker I: The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *The lancet oncology.* **5**(8): 497-508, 2004.
 7. Oskar R: Über die Wirkung fluoreszierenden Stoffe auf Infusorien. *Zeitung Biology.* **39**: 524-6, 1900.
 8. Von Tappeiner H, Jodlbauer A: Über die Wirkung der photodynamischen (fluoreszierenden) Stoffe auf Protozoen und Enzyme. *Deutsche Archiv für Klinische Medizin.* **80**: 427-87, 1904.
 9. Malik Z, Hanania J, Nitzan Y: Bactericidal effects of photoactivated porphyrins—an alternative approach to antimicrobial drugs. *J Photochem Photobiol B.* **5**(3-4): 281-93, 1990.
 10. Meisel P, Kocher T: Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. *J Photochem Photobiol B.* **79**(2): 159-70, 2005.
 11. Stojiljkovic I, Evavold BD, Kumar V: Antimicrobial properties of porphyrins. *Expert Opin Investig Drugs.* **10**(2): 309-20, 2001.
 12. Wainwright M: Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother.* **42**(1): 13-28, 1998.
 13. Carrera ET, Dias HB, Corbi SCT, Marcantonio RAC, Bernardi ACA, Bagnato VS, Hamblin MR, Rastelli ANS: The application of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in dentistry: a critical review. *Laser Phys.* **26**(12), 2016.
 14. Hamblin MR, Hasan T: Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci.* **3**(5): 436-50, 2004.
 15. Ower P, Ciantar M, Newman H, Wilson M, Bulman J: The effects on chronic periodontitis of a subgingivally-placed redox agent in a slow release device. *Journal of Clinical Periodontology.* **22**(6): 494-500, 1995.
 16. Wilson M, Gibson M, Strahan D, Harvey W: A preliminary evaluation of the use of a redox agent in the treatment of chronic periodontitis. *Journal of periodontal research.* **27**(5): 522-7, 1992.
 17. Wilson M, Dobson J, Sarkar S: Sensitization of periodontopathogenic bacteria to killing by light from a low-power laser. *Oral microbiology and immunology.* **8**(3): 182-7, 1993.
 18. Bhatti M, MacRobert A, Henderson B, Wilson M: Exposure of *Porphyromonas gingivalis* to red light in the presence of the light-activated antimicrobial agent toluidine blue decreases membrane fluidity. *Current microbiology.* **45**(2): 118-22, 2002.
 19. Bhatti M, Nair SP, MacRobert AJ, Henderson B, Shepherd P, Cridland J, Wilson M: Identification of photolabile outer membrane proteins of *Porphyromonas gingivalis*. *Current microbiology.* **43**(2): 96-9, 2001.
 20. Bhatti M, MacRobert A, Meghji S, Henderson B, Wilson M: Effect of dosimetric and physiological factors on the lethal photosensitization of *Porphyromonas gingivalis* in vitro. *Photochemistry and photobiology.* **65**(6): 1026-31, 1997.
 21. Akaraphanth R, Kanjanawanitchkul W, Gritiyarangsarn P: Efficacy of ALA - PDT vs blue light in the treatment of acne. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine.* **23**(5): 186-90, 2007.
 22. Akasov R, Sholina N, Khochenkov D, Alova A, Gorelkin P, Erofeev A, Generalova A, Khaydukov E: Photodynamic therapy of melanoma by blue-light photoactivation of flavin mononucleotide. *Scientific reports.* **9**(1): 1-11, 2019.
 23. Choudhary S, Nouri K, Elsaie ML: Photodynamic therapy in dermatology: a review. *Lasers in medical science.* **24**(6): 971-80, 2009.
 24. Hædersdal M, Togsverd-Bo K, Wulf HC: Evidence-based review of lasers, light sources and photodynamic therapy in the treatment of acne vulgaris. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology.* **22**(3): 267-78, 2008.
 25. Kennedy J, Pottier R, Pross D: Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* **6**(1-2): 143-8, 1990.
 26. Kennedy JC, Pottier RH: New trends in photobiology: endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* **14**(4): 275-92, 1992.
 27. NOMOTO R: Effect of light wavelength on polymerization of light-cured resins. *Dental Materials Journal.* **16**(1): 60-73, 111, 1997.
 28. Watts D, Amer O, Combe E: Surface hardness devel-

- opment in light-cured composites. *Dental Materials*. **3** (5): 265-9, 1987.
29. Watts D, Cash A: Analysis of optical transmission by 400-500 nm visible light into aesthetic dental biomaterials. *Journal of dentistry*. **22**(2): 112-7, 1994.
30. Watts DC, Amer O, Combe EC: Characteristics of visible-light-activated composite systems. *British Dental Journal*. **156**(6): 209-15, 1984.
31. Epling GA, Lin C: Photoassisted bleaching of dyes utilizing TiO₂ and visible light. *Chemosphere*. **46**(4): 561-70, 2002.
32. Hanosh FN, Hanosh GS: Vital Bleaching: A New Light-Activated Hydrogen Peroxide System. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*. **4**(3): 90-5, 1992.
33. Yoshino F, Yoshida A, Okada E, Okada Y, Maehata Y, Miyamoto C, Kishimoto S, Otsuka T, Nishimura T, Lee MC: Dental resin curing blue light induced oxidative stress with reactive oxygen species production. *J Photochem Photobiol B*. **114**: 73-8, 2012.
34. Yoshida A, Yoshino F, Makita T, Maehata Y, Higashi K, Miyamoto C, Wada-Takahashi S, Takahashi S S, Takahashi O, Lee MC: Reactive oxygen species production in mitochondria of human gingival fibroblast induced by blue light irradiation. *J Photochem Photobiol B*. **129**: 1-5, 2013.
35. Yoshida A, Iwata S, Iizuka J, Takahashi S-s, Wada-Takahashi S, Miyamoto C, Maehata Y, Ogura Y, Lee M-C-i, Yoshino F: Blue light from dental resin curing unit causes light-induced vasoconstriction in isolated rat aorta. *Oral Health and Dental Management*. **13**: 1147-51, 2014.
36. Yoshida A, Shiotsu-Ogura Y, Wada-Takahashi S, Takahashi S S, Toyama T, Yoshino F: Blue light irradiation-induced oxidative stress in vivo via ROS generation in rat gingival tissue. *J Photochem Photobiol B*. **151**: 48-53, 2015.
37. Yoshida A, Sasaki H, Toyama T, Araki M, Fujioka J, Tsukiyama K, Hamada N, Yoshino F: Antimicrobial effect of blue light using Porphyromonas gingivalis pigment. *Sci Rep*. **7**(1): 5225, 2017.
38. Shiotsu-Ogura Y, Yoshida A, Kan P, Sasaki H, Toyama T, Izukuri K, Hamada N, Yoshino F: Antimicrobial photodynamic therapy using a plaque disclosing solution on Streptococcus mutans. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. **26**: 252-7, 2019.
-