研 究 者：林　桜（所属：東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科 歯周病学分野）

研究題目：LED 光線の歯周病原細菌および歯肉線維芽細胞への影響

目　的：

光線力学療法（photodynamic therapy：PDT）は医科領域において既に多くの基礎研究と臨床応用がなされている。本療法は、特定細胞に特異的に集積する安全性の高い光感受性物質と、これを励起しうる波長のレーザー光を併用することで、活性酸素種を発生させ、その毒性により標的細胞を傷害させるものである。歯科分野においても PDT の適用が検討されるようになり、治療の標的が口腔に存在する病原細菌であるため、抗菌的光線力学療法（antimicrobial photodynamic therapy：aPDT）と呼ばれている（図 1）。組織修復の促進や、炎症の軽減、細菌の殺菌にも使用されてきており、近年では LED を用いた aPDT での治療法が注目されてきている。aPDT に関する研究報告は出てきているが、LED 光単独での殺菌効果に関する研究報告は少なく、生体への影響も含め、明らかにされていない部分が多い。

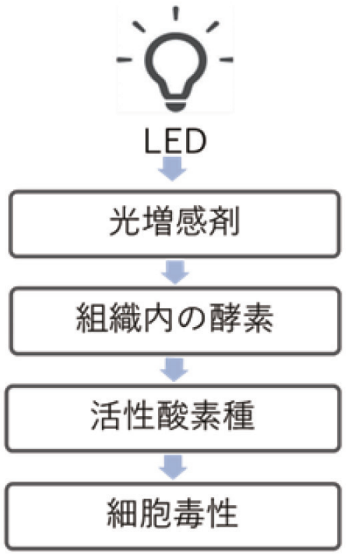

図 1　aPDT のメカニズム

本研究の目的は、LED 光単独での効果に着目し、歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis*（*P. gingivalis*）および歯肉線維芽細胞に対して各種の波長の LED 光照射における抗菌効果、細胞傷害の程度を調査し、口腔内の細菌のコントロールに臨床応用する条件を明らかにすることを目的としている。

対象および方法：

本研究では、365、405、450、470、565、625nm の各種波長の LED 光を用い、*P. gingivalis* と歯肉線維芽細胞に対する効果を比較、検討する。出力は、50-200mW/cm^2、照射時間は 3 分とする。

研究方法は以下の 4 点である。

1. 各波長において出力を変化させて LED 光を照射した場合の *P. gingivalis* への抗菌効果
2. 歯肉線維芽細胞に対する LED 光照射の細胞傷害性
3. LED 光照射後の活性酸素種の産生状況
4. LED 光を照射した後の *P. gingivalis* の遺伝子発現解析

結果および考察：

1．各波長において出力を変化させて LED 光を照射した場合の *P. gingivalis* への抗菌効果

P .gingivalis に対する LED 光照射の効果を、異なる波長（365、405、450、470、565、625 nm）により、コントロール群と比較して検証した。LED 光の波長や出力数によって *P. gingivalis* への抗菌効果が特異的に異なる結果となった。365nm の LED 光で最も抗菌効果が示され、次いで 450nm の LED 光に高い抗菌効果がみられた（図 2）。565nm と 625nm の LED 光では、どの出力数でもコントロール群との間に有意差はなかった。

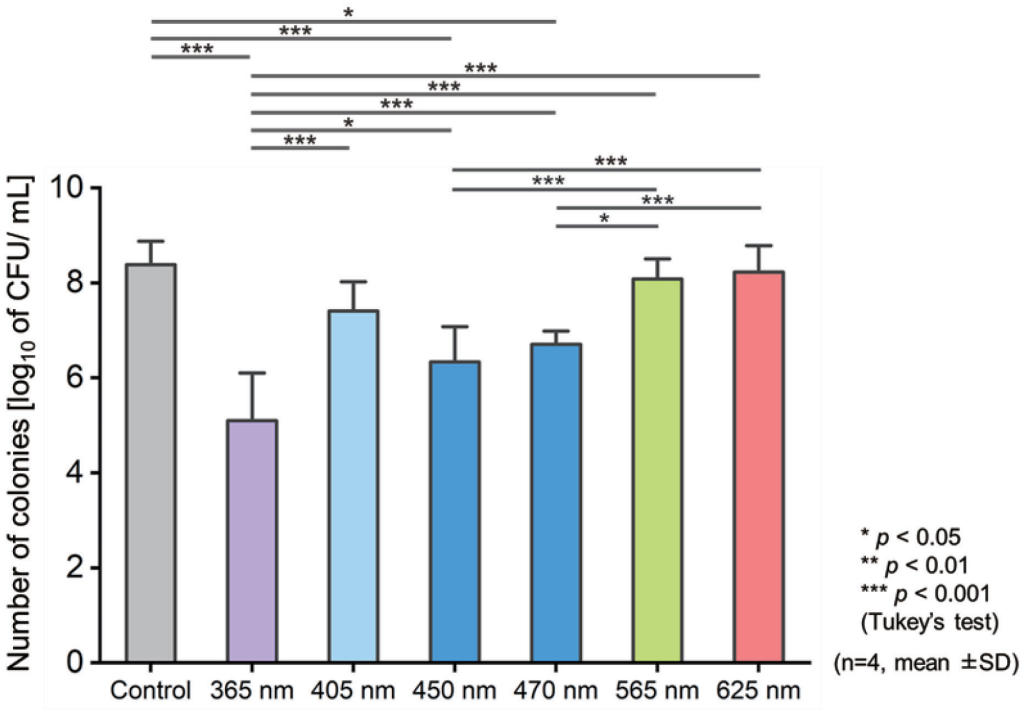

図 2　一定の出力下における異なる波長の LED 照射による抗菌効果

2．歯肉線維芽細胞に対する LED 光照射の細胞傷害性

歯肉線維芽細胞に異なる波長（365、405、450、470、565、625nm）の LED 光で 3 分間照射し、照射 1 日目および 3 日目に、WST-8 アッセイ（Cell Counting Kit-8, Dojindo, Kumamoto, Japan）および LDH（Cytotoxicity Detection Kit, Roche, Mannheim, Germary）を用いて測定した。

365nm の LED は、1 日目と 3 日目にコントロール群と比較し、歯肉線維芽細胞の生存率を約 80% と 60% に低下させた。450nm の LED 光照射では、1 日目および 3 日目の生存率が約 95% および 85% に減少したが、450nm の LED 光では 1 日目のコントロール群との比較で有意な減少はみられなかった。

3. LED 光照射後の活性酸素種の産生状況

細菌実験で殺菌効果が得られた 365、450nm の LED 光照射群と、変化がみられなかった 625nm の LED 光照射群で細胞内の活性酸素種を評価するために、活性酸素測定キット（ROS Assay Kit-Highly Sensitive DCFH-DA；Dojindo, Kumamoto, Japan）を用いて検出した。

450nm の LED 光照射は、照射時間が短いほど活性酸素種の産生増加が大きいことがわかった。450nm の LED 光照射では、1 分と 3 分で 1.3 倍と 1.4 倍の活性酸素種の産生増加がみられた（図 3）。

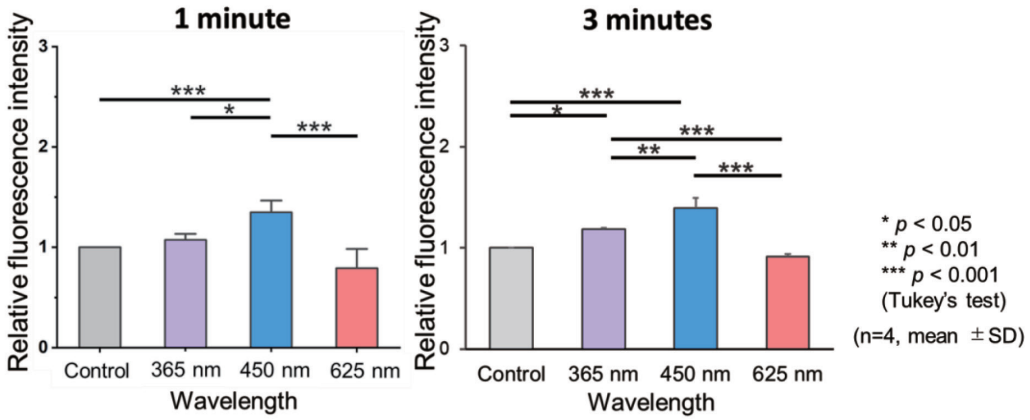

図 3　LED 光照射後の活性酸素種の産生状況

4. LED 光を照射した後の *P. gingivails* の遺伝子発現解析

450nm、625nm の LED 光を 3 分間照射後、*P. gingivalis* 懸濁液を RNA protect™ Bacteria Reagent（Qiagen, Tokyo, Japan）と混合し、細菌内の RNA を安定化した。その後、RT-PCR 法にて DNA 複製、細胞分裂、ジンジパイン関連、線毛関連遺伝子の発現を解析した。450nm の LED 光照射直後において、DNA 複製に関連する遺伝の発現量が減少した。一方、ジンジパイン関連遺伝子、線毛関連遺伝子はコントロール群に比べて有意に上昇した。

成果発表：（予定を含めて口頭発表、学術雑誌など）

・日本レーザー歯学会総会・学術大会にて発表予定

・現在、英語論文の投稿準備中