

論 文 要 旨

新しい歯周炎予防・治療法としての 310 nm UVB-LED の可能性
-特に口腔細菌に対する殺菌作用の検討-

平成 29 年度
北海道医療大学大学院歯学研究科

高田 鮎子

【緒言】

紫外線 (UV) 照射装置は皮膚科の分野で広く使用されており、中でも中波長紫外線 (UVB) におけるナローバンド UVB (311 ± 2 nm) は乾癬やアトピー性皮膚炎等、様々な炎症性皮膚疾患への効果が確認されている。しかしながら、歯科領域での応用例はまだ報告されていない。また、殺菌灯で知られる 265 nm 付近の短波長紫外線 (UVC) に殺菌作用があることはよく知られているが、UVB の殺菌作用についての詳しい報告はほとんどない。そこで、我々は口腔内照射用の 310 nm UVB-LED 試作装置を用いて、口腔細菌に対する殺菌効果と口腔上皮細胞への傷害性の有無を *in vitro* の実験系で評価し、同紫外線が歯周炎治療へ応用可能か否かを検討した。

【材料と方法】

1. 殺菌作用：口腔内仕様にペンタイプに改良した 310 nm UVB-LED 照射装置 1, 2 (日機装株式会社 が試作・提供) を用い、口腔細菌 (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus sauginis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*) に対する殺菌作用を浮遊細菌培養系とバイオフィルム培養系でそれぞれ検討した。
2. 細菌の DNA 損傷の誘導：310 nm UVB-LED 照射によって生じる各細菌の DNA 損傷を、シクロブタンピリミジンダイマー (CPD) の形成量を指標に ELISA で測定した。
3. 細胞傷害性：310 nm UVB-LED 照射による歯肉上皮癌由来細胞株 (Ca9-22) の傷害を細胞内ホルマザン生成量を指標にして検討した。
4. 口腔上皮細胞における活性酸素種の誘導
 - 1) 一酸化窒素 (NO) の産生誘導能：Ca9-22 細胞培養系に 310 nm UVB-LED を照射後、同細胞における NO 産生量を測定した。また、同細胞における誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) の発現を抗 iNOS 抗体を用いた免疫染色と、Real-time PCR 法にて検討した。
 - 2) 過酸化水素 (H₂O₂) の産生誘導能：Ca9-22 細胞培養系に 310 nm UVB-LED を照射後、同細胞における H₂O₂ の産生量を測定した。
5. 活性酸素種による口腔細菌の殺菌：供試細菌培養系における NO と H₂O₂ の殺菌作用を検討した。
6. 細胞間接着因子の発現誘導：不死化口腔上皮由来細胞株 (OBA-9) へ 310 nm UVB-LED を照射後、同細胞における Claudin-1 のタンパク発現をウエスタンブロッティング法で検討した。

統計分析

全ての結果は統計ソフトにて平均値±標準誤差を算出した。また、対照群と実験群間の有意差はANOVA, またはstudentのt検定で解析し, $p < 0.05$ を有意差ありとした。

【結果】

310 nm UVB-LED1 の照射 (105 mJ/cm²: 60 秒間) により *S. muntans* や *P. gingivalis* を含む浮遊培養系の供試細菌の生存率は 40-50 %に低下した。一方, 265 nm UVC-LED の照射 (17 mJ/cm²: 10 秒間) によって, 全ての供試細菌がほぼ 100 %殺菌された(データ示さず)。また, 310 nm UVB-LED2 の 420 mJ/cm² (24 秒間) および 1050 mJ/cm² (60 秒間) の照射によって, バイオフィーム形成系の供試菌も殺菌された。特に, *P. gingivalis* は他の菌と比較して強く殺菌された。加えて, UVB 照射によって同菌内に多くの CPD が生成されることがわかった。また, 265 nm UVC-LED の照射 (17 mJ/cm²:10 秒間) により Ca9-22 細胞は強く傷害されたが, 310 nm UVB-LED の照射 (105 mJ/cm²: 60 秒間) による細胞傷害性は低かった。また, 310 nm UVB-LED の照射 (105 mJ/cm²) は, Ca9-22 細胞における NO と H₂O₂ の産生を誘導した。また, *P. gingivalis* は NO と H₂O₂ に対して強い感受性を示し, 他の供試菌株よりも低い濃度で殺菌された。最後に, 口腔上皮細胞 (OBA-9) に 310nm UVB-LED2 を 10.5 mJ/cm² (6 秒間) 照射することによって, 同細胞における Claudin-1 の発現が誘導された。

【考察】

低線量 (105 mJ/cm²) の310 nm UVB-LED照射 (試作1号機による照射) は265 nm UVC照射と比較して殺菌作用は低かった。一方, 高線量 (1050 mJ/cm²) の310 nm UVB-LED照射 (試作2号機による照射) では, 浮遊細菌だけでなくバイオフィームを形成した口腔細菌に対しても殺菌作用を有することが明らかとなった。従来の殺菌剤ではこのようなバイオフィームに対する効果が充分得られないことから, この作用はUVB-LED照射の利点といえる。一方, 310 nm UVB-LEDの細胞への照射実験では, 単層の歯肉上皮培養系において, 210 mJ/cm²を超える照射量で傷害がみられたが, 105 mJ/cm²以下の照射量では傷害性を示さなかった。口腔上皮の最表層には角質層が重層構造をなしているため, 口腔内ではさらに照射線量を多くすること可能と考えられ, 殺菌作用の増強が期待できる。

310 nm UVB-LED照射は上皮細胞より活性酸素種の産生を誘導することから, それが偏性嫌気性菌である歯周病原菌の殺菌や増殖抑制に効果的である可能性がある。*P. gingivalis* は活性酸素に感受性が高いこと, さらにUVB照射により細菌DNA損傷の指標となるCPDが*P. gingivalis*でより多く生成されることから, 310 nm UVB-LED照射は*P. gingivalis* の殺菌に特に有効である可能性が考えられた。従って, 310 nm UVB-LEDは*P. gingivalis*をはじめとする歯周病原菌を選択的に殺菌する機器として有用であることが示唆された。

近年, 歯周病の病態と接合上皮の細胞間接着因子の発現変化についての研究が進められており, 上皮のバリア機能低下が歯周炎の発症に関わる可能性があることが示されている。本研究の結果から, 低線量の310 nm UVB-LED照射によって上皮細胞におけるClaudin-1の

発現が誘導された。そのため、310 nm UVB-LED照射は口腔上皮バリアを増強することで、歯周炎の発症や進行を予防できる可能性が考えられた。

【結論】

310 nm UVB-LEDは、*P. gingivalis*に対して大量のCPD形成を誘導することで直接的な殺菌作用を示すとともに、口腔上皮細胞から活性酸素種の産生を誘導することにより間接的な殺菌作用を示す可能性が示唆された。また、105 mJ/cm²以下の310 nm UVB-LED照射は口腔上皮細胞への細胞傷害性は少なく、さらに同細胞の細胞接着因子の発現を誘導することで上皮バリア機能を高める可能性が示唆された。以上より、本機器は歯周炎の新しい治療や予防への応用が期待できる。