

論文審査の要旨および担当者

愛知学院大学

報告番号	① 乙 第 号	論文提出者名	藤村 岳樹
論文審査 委員氏名	主査 副査	野口 俊英 千田 彰 前田 初彦	
論文題名	半導体レーザーの低出力照射が 口腔上皮細胞に与える影響		

インターネットの利用による公表用

Photodynamic therapy (PDT) は最大吸収波長の光により励起され、一重項酸素を発生させる光感受性物質とレーザー照射を用いた治療法である。また、細菌を標的とした PDT は antimicrobial PDT (aPDT) と呼ばれ、歯周病治療に有効であることが示唆されている。近年になり、著者らは最大吸収波長を 800nm にもつ光感受性物質であるインドシアニンググリーン (ICG) に着目し、これを封入したナノ粒子を開発し、aPDT に関する基礎的研究を行ってきた。

Developmental endothelial locus-1 (Del-1) は interleukin-17 (IL-17) による炎症性歯槽骨破壊を抑制することが報告された。また、上皮細胞由来の炎症性サイトカインである IL-6 と IL-8 は歯周病の発症と進行に関与していることが知られている。さらに、intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) は好中球の血管内皮細胞への接着においてだけでなく、創傷治癒においても重要な役割を担う事が知られている。

本研究では ICG ナノ粒子を併用した低出力の半導体レーザー照射もしくは、低出力半導体レーザー照射単独の口腔上皮細胞への影響を検討することを目的とし、ヒト口腔上皮細胞株による基礎的研究を行った。

ICG ナノ粒子はポリ乳酸グリコール酸共重合体 (PLGA) を基剤とし、油中エマルション溶媒拡散法により調製し、キトサン修飾を施した。

はじめに、ICG 封入ナノ粒子の組織への到達に関して検討した (愛知学院大学歯学部倫理委員会 承認番号 134)。同意の得られた被験者の歯周ポケット

ット内へ ICG 封入ナノ粒子を注入し、1分経過した後に歯肉サンプルを得た。歯肉サンプルは川本法（凍結切片作成法）にて包埋、連続組織切片作製を行い、光学顕微鏡で観察した。

次にヒト口腔上皮細胞株である Ca9-22 を用いた検討を行った。Ca9-22 を interferon- γ で前処理し、24 時間後に *Escherichia coli* 由来の lipopolysaccharide (LPS) (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) にて刺激した。LPS 刺激より 1 時間後に半導体レーザー照射を行い、その 2 時間後に qPCR に用いる細胞の回収、24 時間後にフローサイトメーターに用いる細胞の回収をそれぞれ行った。qPCR では *De1-1*、*IL-8* および *IL-6* の遺伝子発現について、フローサイトメーターでは *ICAM-1* 発現の検討を行った。

Wound healing assay にはヒト口腔上皮細胞株である SCC-25 を用いた。サブコンフルエントの状態ではピペットチップ先端にて細胞を剥離し、ICG 封入ナノ粒子の添加と半導体レーザーの照射を行った後に培養開始時および培養後 48 時間の剥離部の閉鎖状態を画像解析ソフト Image J を用いて解析した。

なお、使用した半導体レーザー (P-LASER[®]、パナソニック、大阪) は、中心波長 805 \pm 20nm であり、繰り返しパルス照射モード (デューティ比: 10%、パルス幅: 100ms、ピーク出力: 5 W)、照射距離 1 cm、照射時間は 60 秒間とし、これまでの基礎的研究と同条件で使用した。

以上の実験より、以下の結果を得たとしている。

ICG封入ナノ粒子は上皮組織の深層には到達しておらず、上皮組織の表層においてのみ観察された。この結果より ICG ナノ粒子と半導体レーザー照射の併用による aPDT 効果は歯周ポケット内および歯肉上皮組織表層に限定されると考えられた。また、ICG封入ナノ粒子の到達していない歯肉上皮組織においては半導体レーザー照射単独の影響がみられる可能性が示唆された。

抗炎症物質である $De1-1mRNA$ 発現は、半導体レーザー照射群においてコントロール群と比較して有意に増強していた ($p < 0.01$)。次に炎症性サイトカインである IL-6、8 は、LPS 刺激により上昇した mRNA 発現が半導体レーザー照射を行った群において有意に減少していた ($p < 0.01$)。

創傷治癒のマーカーとして検討した ICAM-1 発現は、LPS 刺激+レーザー照射群では LPS 刺激群と比べ ICAM-1 の発現が約3倍増強していた。

Wound healing assay では、細胞剥離部位が遊走、増殖した後に閉鎖された割合は、コントロール群と比較してレーザーを照射した群において有意な増加が認められた ($p < 0.01$)。

以上、本研究の結果より、ICG ナノ粒子を応用した aPDT はこれまでに報告した歯周病関連細菌に対する殺菌能に加え、過度な炎症の抑制や創傷治癒を促進する効果が得られることが期待され、歯科保存学、口腔病理学および関連諸科学に寄与し、博士(歯学)の学位を授与するに値するものと判定した。