

抗菌光線力学療法によるインプラント体表面に付着した  
歯周病原細菌に対する殺菌効果に関する *in vitro* 研究

寺西 麻里奈

5

明海大学大学院 歯学研究科

歯学専攻

(指導：申 基喆 教授)

10

*An in vitro* Study on Bacteriocidal Effects of Antimicrobial  
Photodynamic Therapy against Periodontopathic Bacteria  
Adhered to Implant Surface

15

Marina TERANISHI

Meikai University Graduate School of Dentistry

(Mentor: Prof. Kitetsu SHIN)

## 要 旨

近年，インプラント周囲炎の治療法に抗菌光線力学療法（antimicrobial photodynamic therapy：a-PDT）の臨床応用が検討されてきている．本研究は，培養した歯周病原細菌が付着したインプラント体表面に対する a-PDT による *in vitro* における殺菌効果について検討を行うことを目的とした．歯周病原細菌として *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277 株 (*P. gingivalis*)，*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC43718 株 (*A. actinomycetemcomitans*) を培養し，各培養液中にインプラント体を 48 時間浸漬した．処置群として，無処置の Control 群，メチレンブルー (MB) 塗布のみの MB 群，レーザー照射のみの Laser 群，MB 塗布後レーザーを照射した a-PDT 群とした．その結果 *P. gingivalis*，*A. actinomycetemcomitans* 共に，a-PDT 群は，Control 群，MB 群，Laser 群と比較して有意に生菌数が減少した．また MB 群は，Control 群と比較して有意に生菌数が減少したが，Control 群と Laser 群との間には有意差は認められなかった．さらに lipopolysaccharide (LPS) 活性の測定では，*P. gingivalis*，*A. actinomycetemcomitans* 共に a-PDT 処置後のインプラント体表面から LPS が検出された．

以上の結果から，a-PDT はインプラント体表面に付着した *P. gingivalis*，*A.*

*actinomycescomitans* に対して殺菌効果があるが、LPS は残存するため、インプラント体表面の除染を行うためには、a-PDTに加えて、機械的清掃法を併用する必要があることが示唆された。

- 5 索引用語：インプラント周囲炎，抗菌光線力学療法，歯周病原細菌

## Abstract

Clinical application of antimicrobial photodynamic therapy (a-PDT) has been considered for treatment of peri-implantitis. The aim of this study was to

5 investigate the *in vitro* antimicrobial effects of a-PDT on cultured periodontopathic bacteria adhered to implant surface.

After culturing *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 (*P. gingivalis*) or *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 43718 (*A.*

*actinomycetemcomitans*), implant fixtures were immersed into each culture  
10 fluid for 48 hours. Implants were then divided into the following 4 groups: no irradiation (Control); methylene blue alone (MB); the laser irradiation alone (Laser); the laser irradiation in combination with MB (a-PDT). When compared with the Control, MB, Laser groups, a significant reduction was seen in the a-PDT group in the number of live bacteria on implant fixtures  
15 contaminated by *P. gingivalis* or *A. actinomycetemcomitans*. The number of live bacteria was also reduced significantly in the MB group when compared with the Control group; however, no statistically significant differences were found between the Control and Laser groups. Activity of lipopolysaccharide

(LPS) was detected on the implant surface contaminated by *P. gingivalis* or *A. actinomycetemcomitans* after application of a-PDT.

Although a-PDT had an antimicrobial effect on *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans* adhered to the implant surface, LPS remained on  
5 the implant surface; therefore, in addition to a-PDT and mechanical cleaning is  
necessary in order to eliminate LPS activity from the implant surface.

Keywords: peri-implantitis, antimicrobial photodynamic therapy,  
periodontopathic bacteria

## 緒言

- インプラント治療は歯周病の既往歴を有する患者を含め、様々な症例に行われている。インプラントの治療成績に関する5～21年の調査では、インプラントの生存率はいずれも約90%以上を示しており<sup>1-7)</sup>、予知性の高い欠損補綴の手段として確立されつつある。その一方、歯周炎の既往歴がある患者は既往歴のない患者と比較してインプラント生存率が低いという報告もある<sup>8-10)</sup>。成功率に関しても、Karoussisら<sup>11)</sup>は、歯周炎が原因で歯を喪失した患者では歯周炎以外で歯を喪失した患者よりも有意に低かったと報告している。このようなことから、現在では
- 10 歯周炎の既往を有する患者では、インプラント周囲炎を発症するリスクが高い可能性があると考えられている<sup>11-13)</sup>。また、インプラント治療後に生じる様々な併発症の中では、インプラント周囲炎の有病率が最も高く<sup>14)</sup>、インプラント治療を受けた患者の28～56%と報告されており<sup>15)</sup>、インプラント治療の適応症の拡大により、今後さらに増加する可能性があると考えられている。
- 15 インプラント周囲炎は、インプラント周囲に感染した歯周病原細菌により引き起こされる炎症性病変と定義されており<sup>16, 17)</sup>、インプラント周囲粘膜の発赤、腫脹、ならびにインプラント周囲骨の破壊を特徴とする慢性歯周炎と類似した慢性感染症である。インプラント周囲炎を発症しているインプラント体からは、

- Porphyromonrs gingivalis* (*P. gingivalis*), *Treponema denticola* (*T. denticola*), *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*)<sup>18, 19)</sup> などの慢性歯周炎の活動部位から高頻度に検出される細菌 (Red Complex)<sup>20)</sup> に加えて, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*), *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*) 等のグラム陰性桿菌の検出が報告されている<sup>16, 21)</sup>. つまり, インプラント埋入時における口腔内細菌の存在が, インプラント体表面のバイオフィルム形成に影響することが示唆され, 残存歯の歯肉縁下プラークや歯周ポケット内に存在する歯周病原細菌が, 新たに埋入されたインプラント体に定着する細菌の供給源となっている可能性がある.
- 10 インプラント周囲炎の治療法に関して Mombelli ら<sup>22)</sup> は, 累積的防御治療 (Cumulative interceptive supportive therapy) を提唱した. この治療法では, インプラント周囲炎の進行程度に応じて, 初期病変ではインプラント体表面の機械的清掃と研磨を行い, 順次, 化学的清掃, 抗菌薬の全身投与, 切除療法や再生療法といったインプラント体保存のための外科的治療を追加して行い, 予後不良の場合に
- 15 はインプラント体の撤去を行うことが推奨されている. インプラント周囲炎に対する治療法は, 非外科治療と外科治療と大別されるが, いずれの治療法においても, 汚染したインプラント体の除染, すなわちインプラント体表面に付着した歯石や細菌性プラークの除去が最も重要であると考えられている<sup>22)</sup>.

汚染されたインプラント体表面の清掃法として、プラスチックスケーラー<sup>23, 24)</sup>, 超音波スケーラー<sup>25)</sup>, ラバーカップ<sup>24)</sup>, パウダーフロー<sup>26)</sup>などによる機械的清掃方法, クロルヘキシジン<sup>27)</sup>, クエン酸<sup>28)</sup>, リン酸<sup>29)</sup>などによる化学的清掃方法, あるいはレーザー照射<sup>30-35)</sup>などの方法が検討されている。また, 機械的清掃法だけでは不十分で, 化学的清掃法を併用すると効果的であるとしている報告もあるが<sup>24)</sup>, インプラント周囲炎に対する様々な治療法が検討されているものの, いまだ確立されてないのが現状である<sup>36-39)</sup>。

近年, インプラント周囲炎の新たな治療法として抗菌光線力学療法 (antimicrobial photodynamic therapy : a-PDT) が検討されている<sup>40)</sup>。その作用機序は, 毒性の少ない特定の光感受性薬剤とその物質を特異的に励起させる波長の光を組み合わせることによって, 活性酸素を発生させ, 細菌を殺菌するものである<sup>41, 42)</sup>。a-PDTは生体に対する為害作用が少なく, 非侵襲性であり, 抗菌薬とは異なる作用機序を有しており<sup>43)</sup>, 近年薬剤耐性菌の出現に伴い, 抗菌薬を用いないa-PDTによる殺菌効果が注目されつつある<sup>40)</sup>。しかしながら, 汚染されたインプラント体の殺菌法としてのa-PDTの有効性に関する *in vitro* における研究は極めて少ない。そこで本研究は, *in vitro* において, 歯周病原細菌が付着したインプラント体表面に対するa-PDTの殺菌効果の有効性を検討することを目的とした。



## 材料と方法

### 1. インプラント体

本研究では、直径 3.7 mm, 長径 10.0 mm の表面処理されたスクリータイプ  
5 インプラント体 (TSVB10, Zimmer Dental, Carlsbad, CA, USA) を用いた。インプラ  
ント体表面は溶解性ブラスト材としてハイドロキシアパタイト粒子を噴霧し、表面を  
1~2  $\mu\text{m}$  のマイクロピット状にした後、硝酸による残留ブラスト材の溶解処理を施し  
てある。なお実験には滅菌されたインプラント体を使用した。

### 10 2. 供試菌株と培養条件

インプラント体に付着させる歯周病原細菌として、*P. gingivalis* ATCC 33277 株,  
および *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 株を使用した。*P. gingivalis* におい  
ては、5 mg/ml の yeast extract (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) ,  
hemin 5  $\mu\text{g/ml}$ , menadione 0.5 mg/ml を添加した 37 mg/ml の brain heart infusion  
15 (BHI; Becton Dickinson) 液体培地を用いて、37 °C, 10 % (v/v) CO<sub>2</sub>, 10 % (v/v) H<sub>2</sub>,  
および 80 % (v/v) N<sub>2</sub> の嫌気条件下にて、TE-HER 嫌気培養器 (ヒラサワ製作所, 東  
京) で培養を行った。*A. actinomycetemcomitans* においては、37 mg/ml の BHI に 5  
mg/ml の yeast extract を添加した液体培地を用い、37 °C, 10 % (v/v) CO<sub>2</sub> の好気条

件下にて培養を行った。 *P. gingivalis* および *A. actinomycetemcomitans* をそれぞれ液体培地中で培養し、分光光度計 (Multiskan JX, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) により、波長 670 nm で培養菌液の吸光度が 0.2 となるまで培養した。

5

### 3. a-PDT に使用した器材

a-PDT には、低出力赤色半導体レーザー (Periowave™, Periowave Dental Technologies, Vancouver, Canada) (以下レーザーとする) を用いた。波長は 670 nm, 出力は 220 mW とした。また、光感受性薬剤に 0.01 % メチレンブルー (MB)

10 溶液 (Biogel™, Ondine Biopharma, Vancouver, Canada) を用いた。

### 4. レーザーの照射方法の検討

インプラント体に対するレーザーの照射方法を検討するために、まず照射部位数の設定について検討した。まず、前処置として *P. gingivalis* または *A.*  
15 *actinomycetemcomitans* が入った培養菌液 0.5 ml を 2.5 ml BHI 液体培地に播種し、培養菌液の吸光度が 0.2 となるまで培養、その後インプラント体を菌液にそれぞれ浸漬し 48 時間培養、インプラント体に *P. gingivalis* または *A. actinomycetemcomitans*

を付着させた。その後、非付着性細菌の除去を目的として、リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline : PBS)[ダルベッコ PBS (-) 粉末, 日水製薬, 東京] 10 ml に 30 秒間浸漬した。

- レーザーの照射方法は、インプラントとレーザーのチップ間の距離を 1 mm とし、
- 5 インプラント体とレーザーのチップが等間隔になるように固定した (Fig 1 a, b).

インプラント体に対して、殺菌処置を行わない群をコントロール (Control) とし、MB 塗布後、12 時の位置からレーザー照射する 1 部位、12 時と 6 時の位置でレーザー照射する 2 部位、12, 3, 6, 9 時の位置からレーザー照射する 4 部位、12, 2, 4, 6, 8, 10 時の位置からレーザー照射する 6 部位を設定した (Fig 2)。

- 10 次に、a-PDT における MB およびレーザーの有効性について検討した (Fig 3)。

インプラント体に *P. gingivalis* または *A. actinomycetemcomitans* を付着させたのち、インプラント体に対して、殺菌処置を行わない Control 群、レーザーを用いず MB を塗布する MB 群、MB を塗布せずレーザーを照射する Laser 群、そして、MB を塗布後、レーザーを照射する a-PDT 群を設定した。

- 15 また全ての実験において、嫌気性菌の大気中での影響を考慮して、1 回の実験処置時間は 1 インプラント体あたり最大 15 分以内で行うこととした<sup>44)</sup>。

5. 走査電子顕微鏡 (SEM) によるインプラント体表面の *P. gingivalis* および *A. actinomycetemcomitans* 付着状態の観察

実験後のインプラント体を 24 時間自然乾燥させたのち、電子顕微鏡資料作製用装置 (SC-708MC, サンヨー電子, 東京) を用い、導電処理を行った。走査電子顕微鏡 (JEOL JSM-6360LV, 日本電子, 東京) により、加速電圧 15 kV, 150 倍, 3,500 倍の条件で、インプラント体表面の *P. gingivalis* および *A. actinomycetemcomitans* 付着状態を観察した。

6. 培養法による生菌数の計測

10 インプラント体を 10 ml の PBS が入った 50 ml のコニカルチューブ (Becton Dickinson) に入れ、超音波破碎機 (UD-201, トミー精工, 東京) を用い、で 75W, 1 分間振動させ<sup>25)</sup>、インプラント体から各細菌を剥離させた。*P. gingivalis* はその希釈液 100  $\mu$ l を血液寒天培地に播種し、37 °C, 10 % (v/v) CO<sub>2</sub>, 10 % (v/v) H<sub>2</sub>, および 80 % (v/v) N<sub>2</sub> の嫌気条件下にて 48 時間培養後、colony forming unit (CFU) を計

15 測した。*A. actinomycetemcomitans* は、希釈液 100  $\mu$ l を BHI 寒天培地に播種し、37 °C, 10 % (v/v) CO<sub>2</sub> の好気条件下にて 48 時間培養後、CFU を計測した。

7. Lipopolysaccharide (LPS) 活性の測定

実験後のインプラント体表面に付着した LPS 活性の測定は、トキシンセンサー (GenScript, Piscataway, NJ, USA) を使用した。サンプル 100  $\mu$ l に実験後のインプラント体を加え、さらに LAL (Limulus Amebocyte Lysate) 100  $\mu$ l を加えた後 37  $^{\circ}$ C 10 分間培養した。その後、発色基質溶液 100  $\mu$ l を混和、37 $^{\circ}$ C、6 分間培養し、停止液を 500  $\mu$ l、発色感受性薬剤 2 種を各 500  $\mu$ l 加えた。マイクロプレートリーダー (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) で吸光度測定 (545 nm) を行った。なお、エンドトキシンスタンダードは、*Escherichia. coli* (*E. coli*) エンドトキシンを用い検量線を作成し、エンドトキシン量は、US Standard endotoxin unit (EU) で表し算定した。

10

## 8. 統計学的分析

Control を含む各処置方法の比較は Kruskal-Wallis 順位検定を行った。その結果、有意差が認められた場合は Bonferroni 検定にて多重比較を行った。統計分析には、統計ソフト IBM SPSS statistics 20 (日本アイ・ビー・エム、東京) を使用した。

15

## 結果

### 1. SEMによるインプラント体表面への歯周病原細菌の付着状態の観察結果

歯周病原細菌に汚染されたインプラント体に対する a-PDT の効果を検討するために、インプラント体表面への *P. gingivalis* および *A. actinomycetemcomitans* の付着状態を SEM により観察した。 *P. gingivalis* および *A. actinomycetemcomitans* を付着させていない状態では、インプラント体表面のマイクロピットが明瞭に認められているが、 *P. gingivalis* および *A. actinomycetemcomitans* 付着後ではインプラント体表面の凹凸に各細菌が密に付着していることが確認された (Fig 4).

10

### 2. 照射部位数による残存生菌数の比較

インプラント体に対するレーザーの照射方法を決定するために、まず照射部位数について検討した。 *P. gingivalis* を付着させたインプラント体において、照射部位数の増加により生菌数の減少が認められ、6 部位はすべての群に対して有意に生菌数が減少した (Fig 5)。 *A. actinomycetemcomitans* を付着させたインプラント体においても、照射部位数の増加により生菌数の減少が認められ、6 部位はすべての群に対して有意に生菌数が減少した (Fig 6).

### 3. SEMによる各処置後のインプラント体表面の観察

*P. gingivalis* または *A. actinomycetemcomitans* を付着させたインプラント体表面において、MB および a-PDT 群では、細菌がインプラント体表面を覆っていることが確認された (Fig 7,8). また、a-PDT による表面性状の変化は認められなかつ

5 た.

### 4. 処置後の残存生菌数の比較

照射部位数の検討結果から、6 部位での照射が最も殺菌効果が高かったため、本実験での照射は、6 部位で行った。その結果、*P. gingivalis* を付着させたインプラント体において、a-PDT 群は Control 群、MB 群および Laser 群と比較して、生菌数が有意に減少した (Fig 9). MB 群は Control 群と比較して生菌数が有意に減少したが、Laser 群に対して有意差は認められなかった。また、Laser 群の残存生菌数は Control 群とほぼ同等であり、有意差は認められなかった。

15 *A. actinomycetemcomitans* を付着させたインプラント体においても、a-PDT 群は Control 群、MB 群および Laser 群と比較して、生菌数が有意に減少した (Fig 10).

*P. gingivalis* と同様、MB 群は Control 群と比較して生菌数が有意に減少したが、Laser 群に対して有意差は認められなかった。また、Laser 群の残存生菌数は Control 群とほぼ同じであり、有意差は認められなかった。

## 5. インプラント体表面の LPS 活性の比較

a-PDT による *P. gingivalis* および *A. actinomycetemcomitans* に対する殺菌効果が確認されたが、殺菌後に残存する各菌の菌体成分の有無を確認するために、イン

5 プラント体表面の LPS 活性を測定した。コントロールとして、細菌を含まない培地にインプラント体を浸漬したものでは、a-PDT の有無に関わらず、LPS 活性はほとんど検出されなかった。液体培地にて細菌を付着させた後、a-PDT を行わなかったもの、および a-PDT を行ったものでは、いずれにおいても LPS 活性は検出されたが、両群間に有意差は認められなかった (Fig 11) .

10 *A. actinomycetemcomitans* を用いた場合においても、*P. gingivalis* と同様、C および D において、a-PDT の有無に関わらず LPS 活性は検出されたが、有意差は認められなかった (Fig 12).



## 考察

インプラント周囲組織における炎症性病変は、インプラント周囲粘膜炎またはインプラント周囲炎に分類される<sup>45)</sup>。インプラント周囲粘膜炎はインプラント周囲の軟組織に局限した可逆的な炎症である。一方、インプラント周囲炎はインプラント周囲組織における支持骨の喪失を伴う炎症と定義されている<sup>46)</sup>。インプラント周囲炎は歯周病原細菌による感染が原因となって発症すると考えられており<sup>47)</sup>、歯周炎と類似した臨床症状を示す。しかし、天然歯根とインプラント体では、表面構造や、それぞれを支持している周囲組織に大きな違いがあるため、炎症の波及する経過が異なる<sup>48)</sup>。その結果として、インプラント周囲炎では歯周炎と比較して炎症性細胞浸潤がより急速に広範囲に起こることが報告されている<sup>49, 50)</sup>。インプラント周囲炎は細菌感染により引き起こされるため、インプラント周囲炎治療においては、インプラント表面に付着する細菌を除去することが主要目的となる。本研究結果から、**a-PDT** はインプラント体表面に付着する歯周病原細菌に対して殺菌効果があることが示された。一方、**a-PDT** の生体組織に対する影響については、**Laun** ら<sup>51)</sup> は、**a-PDT** の歯周組織に対する影響について研究したところ、**a-PDT** により歯肉、象牙質、歯髄、歯槽骨では炎症は認められなかったと報告し、また **Komerik** ら<sup>52)</sup> は、**a-PDT** の歯周組織に対する影響について、頬粘膜に対しても炎症を惹起しなかった

と報告している.

一方, インプラント体の表面性状は, マシンサーフェスとラフサーフェスに大別され, 最近ではオッセオインテグレーションを促進させるために, 中等度のラフサーフェスをもつインプラントが多く用いられている. 本研究ではインプラント体表面性状に関して, ブラスト酸処理により表面粗さが 1~2  $\mu\text{m}$  に加工されているインプラント体を使用した. ブラスト酸処理表面はマシンサーフェスに比べて, 骨結合期間およびその生体力学的強度の向上が証明されている<sup>53)</sup>. しかしながら, ラフサーフェスによる表面積の増加は, 細菌の定着を助長させ, プラークの蓄積を著しく増加させる危険性も伴っている. したがって, ラフサーフェスの表面構造を有するインプラントは, プラークの停滞により細菌感染を生じやすいと考えられ, 一旦汚染した凹凸のあるインプラント体表面は除染も困難となる. a-PDT は, 光感受性薬剤にある一定の波長が反応して殺菌効果をもたらすもので, レーザー照射部位に存在する MB が光に反応し, 活性酸素を発生するため, 凹凸のあるインプラント体表面においても確実な殺菌効果が得られたと考えられる. 本研究で示されたインプラント表面での殺菌効果は, ラフサーフェスを有する多くのインプラント体に適応できるものと考えられる.

インプラント周囲炎の局所における細菌叢は, インプラント周囲ポケット内では, *Fusobacterium nucleatum*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *P. gingivalis*, *A.*

*actinomycetemcomitans*などの歯周病原細菌の存在が明らかになっており<sup>18, 19, 21)</sup>, 歯周炎罹患歯での歯周ポケット内細菌と細菌叢が類似していると考えられている。

*P. gingivalis*は、慢性歯周炎と関係の強い Red Complex<sup>20)</sup>の一つである偏性嫌気性

桿菌であることから、本実験に使用した。嫌気性菌は、大気中で2時間生存可能で

5 あることが報告されているため<sup>44)</sup>, 本研究では、嫌気性菌の大気中の生存を考慮し

て、1回の実験処置時間を1インプラント体あたり最大15分以内で行った。また、

インプラント周囲溝では特に *A. actinomycetemcomitans* が多く認められたとする

報告<sup>54)</sup>や、残存歯の歯周ポケットでは検出されない場合でもインプラント周囲ポ

ケットでは *A. actinomycetemcomitans* が検出されるといった報告があり<sup>16)</sup>, イン

10 プラント周囲炎と *A. actinomycetemcomitans* の局在について関係があるものと推

察されることから、*A. actinomycetemcomitans* も実験に使用した。

本研究におけるレーザーの照射条件については、レーザーの照射部位数における殺菌効果の違いを検討するために1, 2, 4, 6か所の照射部位で照射実験を行った。

その結果、6部位で照射した場合に有意に細菌数が減少した。Marottiら<sup>55)</sup>は、細

15 菌を付着させたインプラント体に光感受性薬剤としてメチレンブルーを塗布後、ダ

イオードレーザーを3分間および5分間照射し、それぞれの殺菌効果を検討した結

果、5分間照射群でより殺菌効果が高かったと報告している。しかしながら、イン

プラント体の照射部位数に関しては検討していなかった。*In vitro*において、チタ

ン表面に対するレーザーの殺菌効果を検討した論文は過去にも報告されているが<sup>56, 57)</sup>、多くの研究がチタンプレートに対してレーザー照射を行っているため、照射部位数に関しては明記されていなかった。本研究では、チタンプレートでなく実際に臨床で用いられているインプラント体を被験体に用いており、レーザー照射した

5 部位のみ殺菌効果が得られることが本研究結果から示された。

また、本研究における各処置後の SEM 画像では、インプラント体表面に付着した細菌の付着状態に肉眼的変化は認められなかった。Kreisler ら<sup>58)</sup>は、サンドブラストエッチング処理を行ったチタンディスクに Er:YAG レーザーを照射し、走査電子顕微鏡によりディスク表面の観察を行った。その結果、波長 2940 nm、パルス

10 エネルギー60~500 mJ の Er:YAG レーザーでチタンディスク表面が熔融した像が観察されたと報告している。Er:YAG レーザーは、水への吸収性を持ち、蒸散作用により細菌の除染が行われると考えられている。本実験では 半導体レーザーを使用した。その作用機序は毒性を持たない光感受性薬剤とその物質を特異的に励起させる波長の光を組み合わせることによって、活性酸素を発生させ、細菌を殺菌する

15 ものである。本研究では半導体レーザーをインプラント体に接触させずに照射を行った。その結果、蒸散作用が起きず、細菌が残存し、インプラント表面構造には影響を与えないことが確認できた。

a-PDT の殺菌効果について Marotti ら<sup>55)</sup>は、細菌が付着したインプラント体の

殺菌には、光感受性薬剤とレーザー照射を併用することが効果的であると報告している。Dobson と Wilson<sup>59)</sup>、および Prates ら<sup>60)</sup> も、光感受性薬剤単独またはレーザー照射単独では、殺菌効果が得られないと報告している。本研究においても、光感受性薬剤とレーザー照射を併用することにより、他群と比較して高い殺菌効果が得られた。Street ら<sup>61)</sup> は、無処置をコントロール群とし、レーザー照射のみを行う群、MB 塗布後レーザー照射を行わない群、MB 塗布後レーザー照射を行う a-PDT 群の 4 群に分け、各効果を比較した。その結果、a-PDT 群では他群と比較して生菌数が有意に減少したが、他群間内では有意差は認められなかったと報告している。本研究では、MB 群の生菌数減少が認められ、このことは Street らの報告とは異なる。MB は、レーザーを照射しなくても、可視光線によってもわずかに活性酸素が発生し殺菌効果を示すため、本研究においては可視光線の影響による生菌数の減少があった可能性が考えられる<sup>62)</sup>。

さらに a-PDT による殺菌処置後における細菌の LPS 活性について調べた。

Kömerik ら<sup>63)</sup>は、*E. coli* の LPS および *Pseudomonas aeruginosa* のプロテアーゼにトルイジンブルーを加え He-Ne レーザーを照射したところ、LPS の活性が減少したと報告している。しかし、本研究においては、a-PDT を行っても LPS が Control 群と同程度残存するという結果になった。この理由として、光感受性薬剤とレーザーの種類や出力の違いがあると考えられる。

本研究では、a-PDT を行った後も、細菌由来の LPS 活性は残存することが確認された。a-PDT はあくまでも殺菌を目的としており、インプラント体表面の付着物を除去する効果はないと考えられる。現在、インプラント周囲炎に対する a-PDT の臨床研究では、a-PDT と機械的清掃法や化学的療法、外科的処置等を併用した研究が報告されている<sup>64, 65)</sup>。しかし、a-PDT の効果を他の治療法と併用した場合の臨床効果については未だ報告が少ないため、今後の研究が必要である。

## 結論

本研究において、 $\alpha$ -PDT は、インプラント体表面に付着した歯周病原細菌に対して殺菌効果があることが示唆された。しかしながら、LPS 活性は残存するため、インプラント体表面の除染を行うためには、機械的清掃法を併用する必要があることが示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり，本研究にご理解，またご指導，ご校閲を賜りました本学  
大学院歯学研究科歯学専攻環境生態免疫系口腔生態免疫研究群口腔微生物学 大  
5 森 喜弘教授，ならびに理工系歯科器材研究群歯科材料学 中畠 裕教授，理工系  
歯材応用研究群歯科補綴学Ⅱ 藤澤 政紀教授に深甚なる謝意を表します．ま  
た，御協力いただいた本学歯学部口腔生物再生医工学講座歯周病学分野教室員の  
先生方に，心より感謝申し上げます．

最後に，本研究を遂行するにあたり，レーザー照射用器材を提供していただい  
10 た有限会社ウェイブレングスに感謝いたします．

本研究の一部は，明海歯科医学会第 20 回学術大会（埼玉）および第 56 回春季  
に日本歯周病学会学術大会（船堀）において発表した．



## 引用文献

- 1) Hultin M, Gustafsson A and Klinge B: Long-term evaluation of osseointegrated dental implants in the treatment of partly edentulous patients. *J Clin Periodontol* **27**, 128-133, 2000
- 2) Weibrich G, Buch RS, Wegener J and Wagner W: Five-year prospective follow-up report of the Astra tech standard dental implant in clinical treatment. *Int J Oral Maxillofac Implants* **16**, 557-562, 2001
- 3) KnauF M, Gerds T, Muche R and Strub JR: Survival and success rates of 3i implants in partially edentulous patients: results of a prospective study with up to 84-months' follow-up. *Quintessence Int* **38**, 643-651, 2007
- 4) Schwartz-Arad D, Kidron N and Dolev E: A long-term study of implants supporting overdentures as a model for implant success. *J Periodontol* **76**, 1431-1435, 2005
- 5) Jung RE, Pjetursson BE, Glauser R, Zemebic A, Zwahlen M and Lang NP: A systematic review of the 5-year survival and complication rates of implant-supported single crowns. *Clin Oral Implants Res* **19**, 119-30, 2008
- 6) Lambrecht JT, Filippi A, Künzel AR and Schiel HJ: Long-term evaluation of submerged and nonsubmerged ITI solid-screw titanium implants: a 10-year life table analysis of 468 implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* **18**, 826-834, 2003
- 7) Moy PK, Medina D, Sherry V and Aghaloo TL: Dental implant failure rates and associated risk factors. *Int J Oral Maxillofac Implants* **20**, 569-577, 2005

- 8) Wagenberg B, Froum SJ: A retrospective study of 1925 consecutively placed immediate implants from 1988 to 2004. *Int J Oral Maxillofac Implants* **21**, 71-80, 2006
- 9) Roos-Jansåker AM, Lindahl C, Renvert H, Renvert S: Nine- to fourteen-year follow-up of implant treatment. Part I: implant loss and associations to various factors. *J Clin Periodontol* **33**, 283-9, 2006
- 10) Evian CI, Emling R, Rosenberg ES, Waasdorp JA, Halpern W, Shah S, Garcia M: Retrospective analysis of implant survival and the influence of periodontal disease and immediate placement on long-term results. *Int J Oral Maxillofac Implants* **19**, 393-8, 2004
- 11) Karoussis IK, Salvi GE, Heitz-Mayfield LJ, Brägger U, Hämmerle CH, Lang NP: Long-term implant prognosis in patients with and without a history of chronic periodontitis: a 10-year prospective cohort study of the ITI Dental Implant System. *Clin Oral Implants Res* **14**, 329-39, 2003
- 15) 12) Klokkevold PR, Han TJ: How do smoking, diabetes, and periodontitis affect outcomes of implant treatment? *Int J Oral Maxillofac Implants* **22**, Suppl: 173-202, 2007
- 13) Schou S: Implant treatment in periodontitis-susceptible patients: a systematic review. *J Oral Rehabil* **35** Suppl 1: 9-22, 2008
- 20) 14) Berglundh T, Persson L and Klinge B: A systematic review of the incidence of biological and technical complications in implant dentistry reported in prospective longitudinal studies of at least 5 years. *J Clin Periodontol* **29** (Suppl 3): 197-212 2002
- 25) 15) Zitzmann NU and Berglundh T: Definition and prevalence of peri-implant diseases. *J Clin Periodontol* **35** (Suppl 8): 286-291, 2008

- 16) Hultin M, Gustafsson A, Hallström H, Johansson LA, Ekfeldt A and Klinge B: Microbiological findings and host response in patients with peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res* **13**, 349-358, 2002
- 17) Heitz-Mayfield LJ and Lang NP: Comparative biology of chronic and aggressive periodontitis vs. peri-implantitis. *Periodontol 2000* **53**, 167-81, 2010
- 18) Botero JE, Gonzalez AM, Mercado RA, Olave G and Contreras A: Subgingival microbiota in peri-implant mucosa lesions and adjacent teeth in partially edentulous patients. *J Periodontol* **76**, 1490-1495, 2005
- 19) Apse P, Zarb GA, Schmitt A and Lewis DW: The longitudinal effectiveness of osseointegrated dental implants. The Toronto Study: peri-implant mucosal response. *Int J Periodontics Restorative Dent* **11**, 94-111, 1991
- 20) Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C and Kent RL Jr: Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* **25**, 134-44, 1998
- 21) van Winkelhoff AJ and Wolf JW: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated peri-implantitis in an edentulous patient. A case report. *J Clin Periodontol* **11**, 511-520, 2000
- 22) Mombelli A and Lang NP: The diagnosis and treatment of peri-implantitis. *Periodontol 2000* **17**, 63-76, 1998
- 23) Speelman JA, Collaert B and Klinge B: Evaluation of different methods to clean titanium abutments. A scanning electron microscopic study. *Clin Oral Implants Res* **3**, 120-127, 1992
- 24) 織井 弘道, 森谷 良智, 難波 幸一, 海老原 直樹, 川本 和弘, 伊藤 公一, 村井 正大: 種々の清掃法がチタンプレートの表面性状ならびに培養細胞の付着数と形態に及ぼす影響. *日歯周病会誌* **39**, 495-502, 1997
- 25) Sato S, Kishida M and Ito K: The comparative effect of ultrasonic scalers on titanium surfaces: an in vitro study. *J Periodontol* **75**, 1269-1273, 2004

- 26) Parham PL Jr, Cobb CM, French AA, Love JW, Drisko CL, Killoy WJ.:  
Effects of an air-powder abrasive system on plasma-sprayed titanium implant  
surfaces: an in vitro evaluation. *J Oral Implantol.* **15**, 78-86, 1989
- 27) Schou S, Holmstrup P, Jørgensen T, Skovgaard LT, Stoltze K, Hjørting-  
5 Hansen E and Wenzel A: Implant surface preparation in the surgical treatment  
of experimental peri-implantitis with autogenous bone graft and ePTFE  
membrane in cynomolgus monkeys. *Clin Oral Implants Res* **14**, 412-422, 2003
- 28) Meffert RM: Periodontitis vs. peri-implantitis: the same disease? The same  
treatment? *Crit Rev Oral Biol Med* **7**, 278-91, 1996
- 10 29) Strooker H, Rohn S and Van Winkelhoff AJ: Clinical and microbiologic  
effects of chemical versus mechanical cleansing in professional supportive  
implant therapy. *Int J Oral Maxillofac Implants* **13**, 845-50, 1998
- 30) Schwarz F, Sculean A, Romanos G, Hertel M, Horn N, Scherbaum W and  
15 Becker J: Influence of different treatment approaches on the removal of early  
plaque biofilms and the viability of SAOS2 osteoblasts grown on titanium  
implants. *Clin Oral Investig* **9**, 111-7, 2005
- 31) Schwarz F, Sculean A, Rothamel D, Schwenzer K, Georg T and Becker J:  
Clinical evaluation of an Er:YAG laser for nonsurgical treatment of peri-  
implantitis: a pilot study. *Clin Oral Implants Res* **16**, 44-52, 2005
- 20 32) Kreisler M, Kohnen W, Christoffers AB, Götz H, Jansen B, Duschner H and  
d'Hoedt B: *In vitro* evaluation of the biocompatibility of contaminated implant  
surfaces treated with an Er : YAG laser and an air powder system. *Clin Oral  
Implants Res* **16**, 36-43, 2005
- 33) Kreisler M, Kohnen W, Marinello C, Schoof J, Langnau E, Jansen B and  
25 d'Hoedt B: Antimicrobial efficacy of semiconductor laser irradiation on  
implant surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants* **18**, 706-11. 2003

- 34) Shibli JA, Martins MC, Nociti FH Jr, Garcia VG and Marcantonio E Jr: Treatment of ligature-induced peri-implantitis by lethal photosensitization and guided bone regeneration: a preliminary histologic study in dogs. *J Periodontol* **74**, 338-45, 2003
- 5 35) Kreisler M, Kohnen W, Marinello C, Götz H, Duschner H, Jansen B and d'Hoedt B; Bactericidal effect of the Er:YAG laser on dental implant surfaces: an *in vitro* study. *J Periodontol* **73**, 1292-8, 2002
- 36) 細田 幸子, 辰巳 順一, 谷田部 一大: インプラント周囲炎の治療に関する基礎的研究 -インプラント用チタン合金表面に付着した歯周病原性細菌の除染に関する *in vitro* 研究- *日本歯科保存学雑誌* **50**, 365-372, 2007
- 10 37) 松井 孝道: CIST を用いたインプラント周囲炎の治療選択 その考察と臨床応用 *Quintessence DENTAL Implantology* **12**, 429-444, 2005
- 38) Schou S, Berglundh T and Lang NP: Surgical treatment of peri-implantitis. *Int J Oral Maxillofac Implants* **19**, suppl: 140-9, 2004
- 15 39) 谷田部 一大, 辰巳 順一, 成田 宗隆, 児島 暁, 大橋 敏雄, 申 基喆: インプラント用チタン合金試料への *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* の付着とその除染方法に関する研究. *明海歯科医学* **37**, 101-113, 2008
- 40) Deppe H, Mücke T, Wagenpfeil S, Kesting M, Sculean A: Nonsurgical antimicrobial photodynamic therapy in moderate vs severe peri-implant defects: a clinical pilot study. *Quintessence Int* **44**, 609-18, 2013
- 20 41) Wilson M, Dobson J, Harvey W: Sensitization of oral bacteria to killing by low-power laser radiation. *Curr Microbiol* **25**, 77-81, 1992
- 42) Ochsner M: Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J Photochem Photobiol B.* **39**, 1-18, 1997
- 25 43) van Winkelhoff AJ, Rams TE and Slots J: Systemic antibiotic therapy in periodontics. *Periodontol* **2000** **10**, 45-78, 1996

- 44) Rolfe RD, Hentges DJ, Campbell BJ, Barrett JT: Factors related to the oxygen tolerance of anaerobic bacteria. *Appl Environ Microbiol* **36**, 306-13, 1978
- 45) Lindhe J and Meyle J; Group D of European Workshop on Periodontology  
5 Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol* **35**, 282-285, 2008
- 46) Albrektsson T and Isidor F: Consensus report of session IV. In: Lang NP and Karring T, (eds). *Proceedings of the 1st European workshop on Periodontology*. London: Quintessence, 365-369, 1994
- 10 47) Uribe R, Penarrocha M, Sanchis JM and Garcia O: Marginal peri-implantitis due to occlusal overload. A case report. *Med Oral* **9**, 159-60, 2004
- 48) Abrahamsson I, Berglundh T and Lindhe J: Soft tissue response to plaque formation at different implant systems. A comparative study in the dog. *Clin Oral Implants Res* **9**, 73-79, 1998
- 15 49) Gualini F and Berglundh T: Immunohistochemical characteristics of inflammatory lesions at implants. *J Clin Periodontol* **30**, 14-8, 2003
- 50) Lindhe J, Berglundh T, Ericsson I, Liljenberg B and Marinello C: Experimental breakdown of peri-implant and periodontal tissues. A study in the beagle dog. *Clin Oral Implants Res* **3**, 9-16, 1992
- 20 51) Luan XL, Qin YL, Bi LJ, Hu CY, Zhang ZG, Lin J, Zhou CN: Histological evaluation of the safety of toluidine blue-mediated photosensitization to periodontal tissues in mice. *Lasers Med Sci* **24**, 162-6, 2009
- 52) Kömerik N, Curnow A, MacRobert AJ, Hopper C, Speight PM, Wilson M:  
25 Fluorescence biodistribution and photosensitising activity of toluidine blue O on rat buccal mucosa. *Lasers Med Sci* **17**, 86-92, 2002

- 53) Ogawa T, Ozawa S, Shih JH, Ryu KH, Sukotjo C, Yang JM and Nishimura I: Biomechanical evaluation of osseous implants having different surface topographies in rats. *J Dent Res* **79**, 1857-63, 2000
- 54) Augthun M and Conrads G: Microbial findings of deep peri-implant bone defects. *Int J Oral Maxillofac Implants* **12**, 106-12, 1997
- 55) Marotti J, Tortamano P, Cai S, Ribeiro MS, Franco JE and de Campos TT: Decontamination of dental implant surfaces by means of photodynamic therapy. *Lasers Med Sci* **28**, 303-9, 2013
- 56) Haas R, Dörtbudak O, Mensdorff-Pouilly N and Mailath G: Elimination of bacteria on different implant surfaces through photosensitization and soft laser. An in vitro study. *Clin Oral Implants Res* **8**, 249-54, 1997
- 57) Giannelli M, Bani D, Tani A, Pini A, Margheri M, Zecchi-Orlandini S, Tonelli P and Formigli L: In vitro evaluation of the effects of low-intensity Nd:YAG laser irradiation on the inflammatory reaction elicited by bacterial lipopolysaccharide adherent to titanium dental implants. *J Periodontol* **80**, 977-84, 2009
- 58) Kreisler M, Götz H, Duschner H: Effect of Nd:YAG, Ho:YAG, Er:YAG, CO<sub>2</sub>, and GaAlAs laser irradiation on surface properties of endosseous dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* **17**, 202-11, 2002
- 59) Dobson J and Wilson M: Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. *Arch Oral Biol* **37**, 883-7, 1992
- 60) Prates RA, Yamada AM Jr, Suzuki LC, Eiko Hashimoto MC, Cai S, Gouw-Soares S, Gomes L and Ribeiro MS: Bactericidal effect of malachite green and red laser on *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Photochem Photobiol B* **3**, 70-6, 2007

- 61) Street CN, Gibbs A, Pedigo L, Andersen D and Loebel NG: *In vitro* photodynamic eradication of *Pseudomonas aeruginosa* in planktonic and biofilm culture. *Photochem Photobiol* **85**, 137-43, 2009
- 62) Schaefer FC, Zimmermann WD: Self-oxidation of methylene blue.  
5 *Nature* **220**, 66-7, 1968
- 63) Nurgül K, Michael W and Poole S: The effect of photodynamic action on two virulence factors of gram-negative bacteria. *Photochemistry and photobiology* **72**, 676–680, 2000
- 64) Dörtbudak O, Haas R, Bernhart T and Mailath-Pokorny G: Lethal  
10 photosensitization for decontamination of implant surfaces in the treatment of peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res* **12**, 104-8, 2001
- 65) Schär D, Ramseier CA, Eick S, Arweiler NB, Sculean A and Salvi GE: Anti-infective therapy of peri-implantitis with adjunctive local drug delivery or photodynamic therapy: six-month outcomes of a prospective randomized  
15 clinical trial. *Clin Oral Implants Res* **24**, 104-10, 2013



## Figure legends

**Fig 1 Schematic drawing of an a-PDT irradiation in this study.**

a: A device was developed for maintaining a constant distance between the laser's fiber optic extremity and implant surface.

b: The laser was keeping the fiber optics at 1mm distance.

**Fig 2 Schematic drawing of the experiment about irradiation position.**

Control: Cultured periodontopathic bacteria was adhered to implant surface without MB and irradiation.

1P: irradiated from one position (12 o'clock position) in combination with MB after the bacteria was adhered to implant surface.

2P: irradiated from two positions (12 and 6 o'clock position) in combination with MB after the bacteria was adhered to implant surface.

4P: irradiated from four positions (12, 3, 6 and 9 o'clock position) in combination with MB after the bacteria was adhered to implant surface.

6P: irradiated from six positions (12, 2, 4, 6, 8 and 10 o'clock position ) in combination with MB after the bacteria was adhered to implant surface.

**Fig 3 Schematic drawing of the experiment about effect of MB, laser and an a-PDT irradiation in this experiment.**

Control: Bacteria was adhered to implant surface without MB and irradiation.

MB: MB was applied without laser irradiation after the bacteria was adhered to implant surface.

Laser: Laser was irradiated without application of MB after the bacteria was adhered to implant surface.

a-PDT: The laser was irradiated in combination with MB after the bacteria was adhered to implant surface.

**Fig 4 SEM images of the implant surface before and after adherence of periodontopathic bacteria. (×150, ×3500)**

a: untreated

b: a soaked in the *P. gingivalis* culture.

c: a soaked in the *A. actinomycetemcomitans* culture.

**Fig 5 Bacteriocidal effects of a-PDT on *P. gingivalis*.**

Control: no MB and irradiation

1P: 1 position irradiation

2P: 2 positions irradiation

4P: 4 positions irradiation

6P: 6 positions irradiation

Each column and bar represents the mean  $\pm$  SD of six implants

(\*  $P < 0.05$ )

**Fig 6 Bacteriocidal effects of a-PDT on *A. actinomycetemcomitans*.**

Control: no MB and irradiation

1P: 1 position irradiation

2P: 2 positions irradiation

4P: 4 positions irradiation

6P: 6 positions irradiation

Each column and bar represents the mean  $\pm$  SD of six implants

(\*  $P < 0.05$ )

**Fig 7 SEM observations of the surface after irradiation (*P. gingivalis*)**

Sample: without adherence of *P. gingivalis*.

Control: Bacteria was adhered to implant surface without MB and irradiation.

MB: MB was applied without laser irradiation after the bacteria was adhered to implant surface.

Laser: Laser was irradiated without application of MB the after the bacteria was adhered to implant surface.

a-PDT: The laser was irradiation in combination with MB after the

bacteria was adhered to implant surface.

**Fig 8 SEM observations of the surface after irradiation (*A. actinomycescomitans*)**

Sample: without adherence of *A. actinomycescomitans*.

Control: Cultured periodontopathic bacteria was adhered to implant surface without irradiation.

MB: MB was applied without laser irradiation after the bacteria was adhered to implant surface.

Laser: Laser was irradiated without application of MB the after the bacteria was adhered to implant surface.

a-PDT: The laser was irradiation in combination with MB after the bacteria was adhered to implant surface.

**Fig 9 Bacteriocidal effects of a-PDT on *P. gingivalis*.**

Each column and bar represents the mean  $\pm$  SD of six implants

(\*  $P < 0.05$ )

**Fig 10 Bacteriocidal effects of a-PDT on *A. actinomycescomitans*.**

Each column and bar represents the mean  $\pm$  SD of six implants

(\*  $P < 0.05$ )

**Fig 11** Residual *P. gingivalis* LPS on implant surface after treatment of a-PDT.

Statistically significant difference between a and b (\*  $P < 0.05$ ).

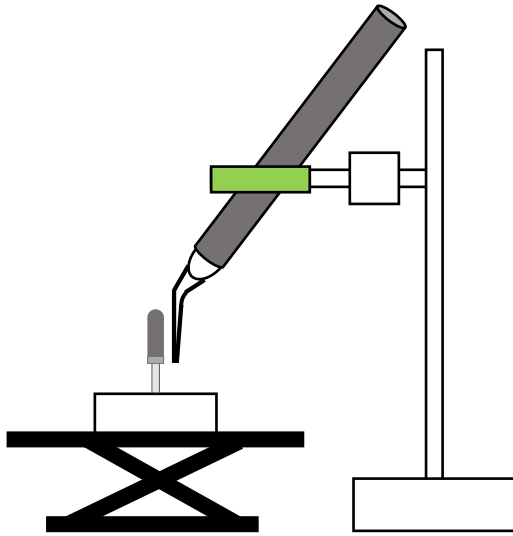
Each column and bar represents the mean  $\pm$  SD of six implants.

**Fig 12** Residual *A. actinomycetemcomitans* LPS on implant surface after treatment of a-PDT.

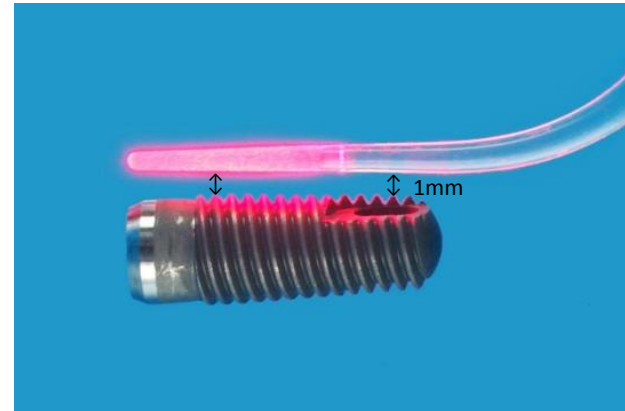
Statistically significant difference between a and b (\*  $P < 0.05$ ).

Each column and bar represents the mean  $\pm$  SD of six implants.

Fig 1



a

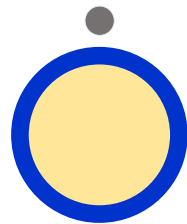


b

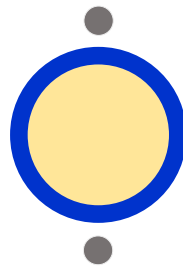
Fig 2



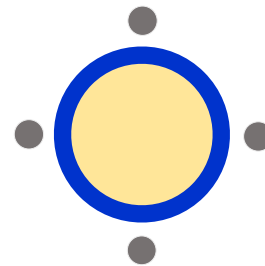
Control



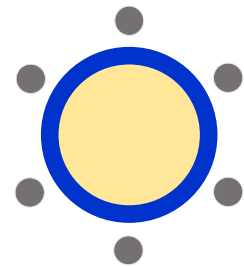
1P



2P

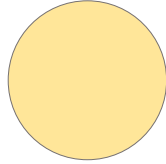


4P

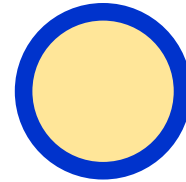


6P

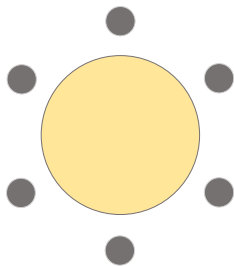
Fig 3



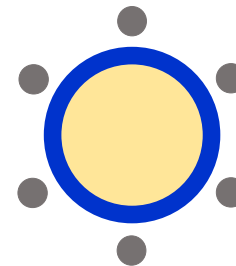
Control  
: Laser (-), MB (-)



MB  
: Laser (-), MB (+)



Laser  
: Laser (+), MB (-)

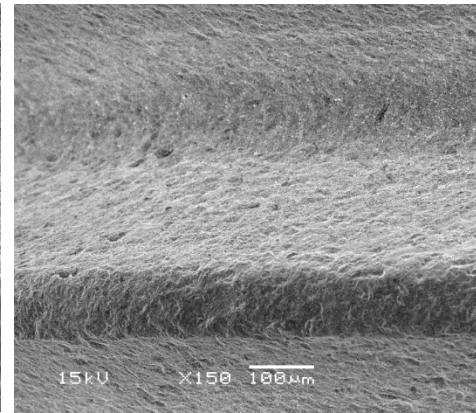
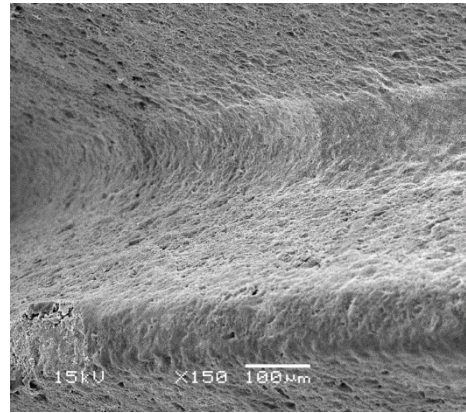
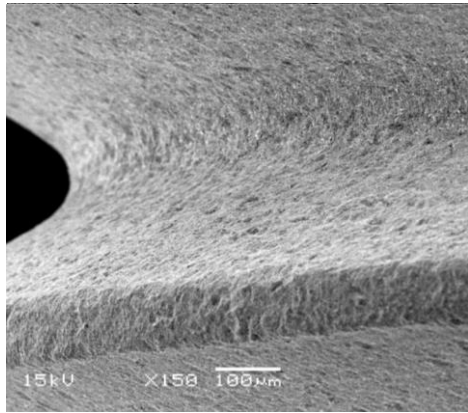


a-PDT  
: Laser (+), MB (+)

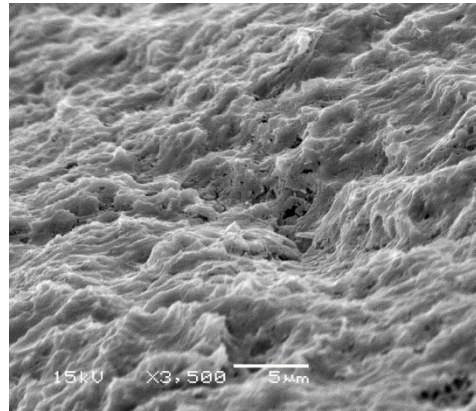
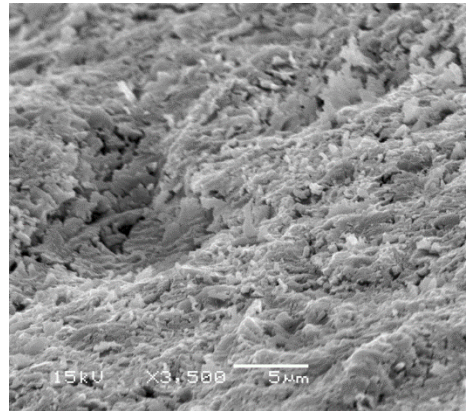
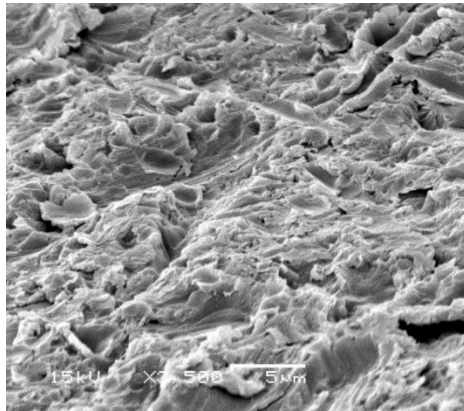


Fig 4

× 150



× 3500



a

b

c

Fig 5

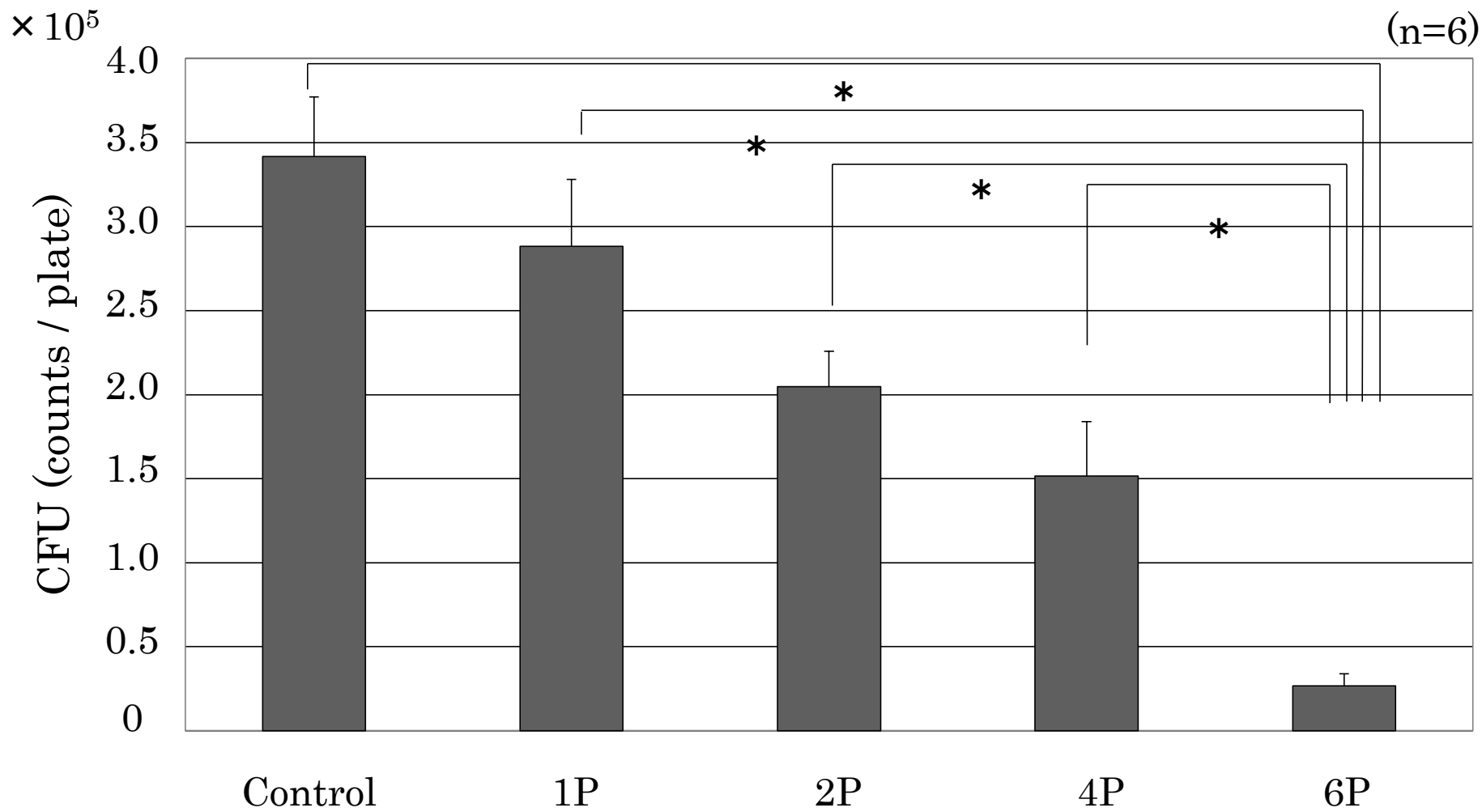


Fig 6

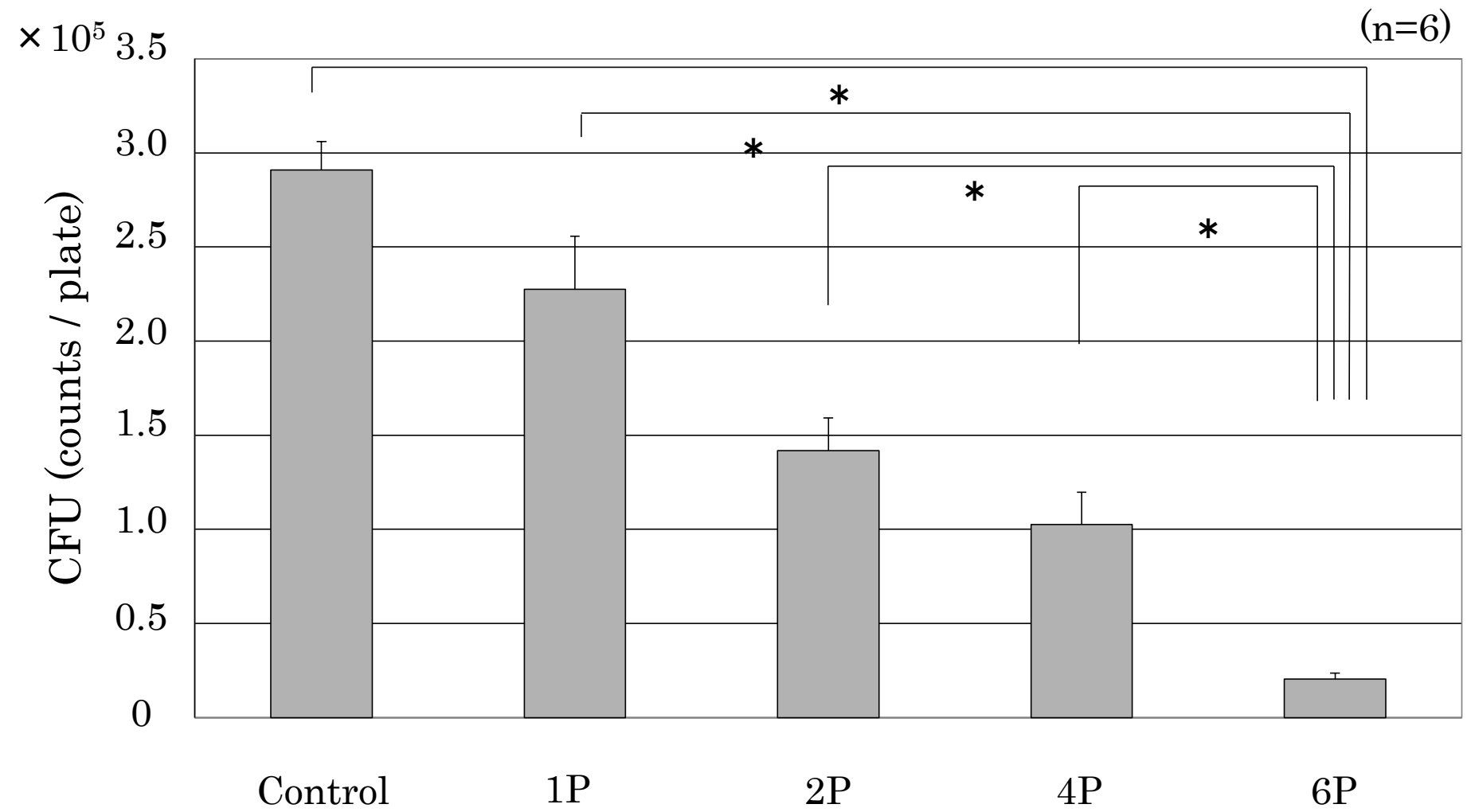
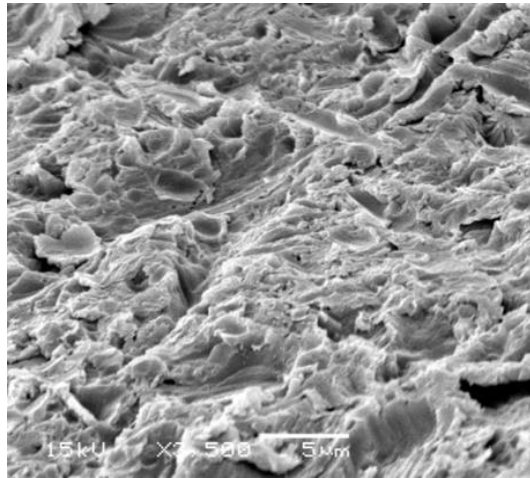
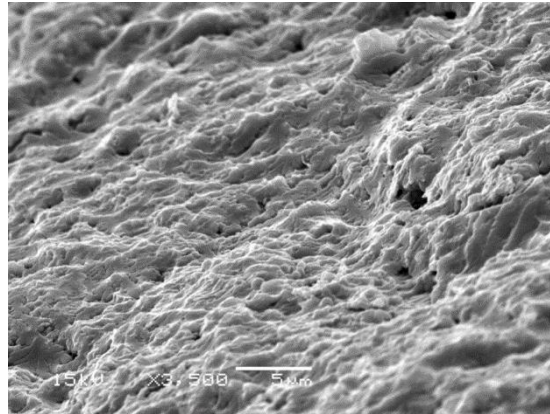


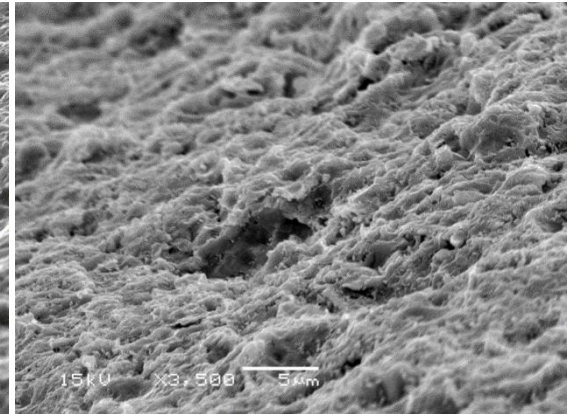
Fig 7



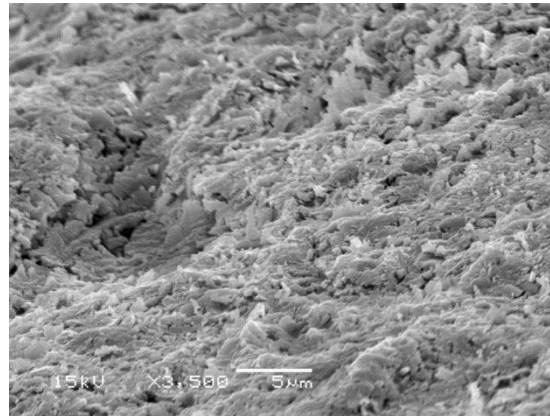
Sample



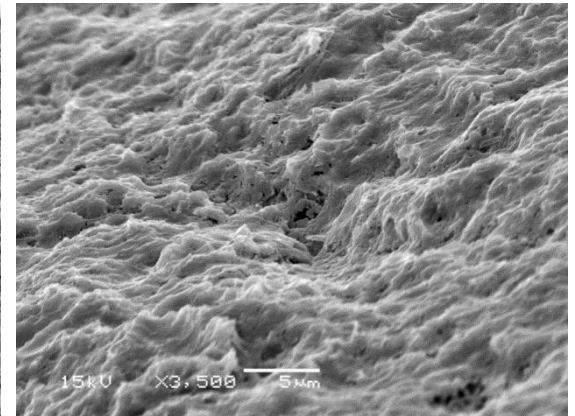
Control



MB

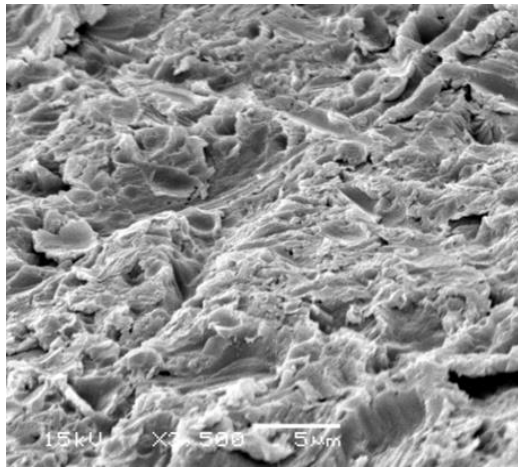


Laser

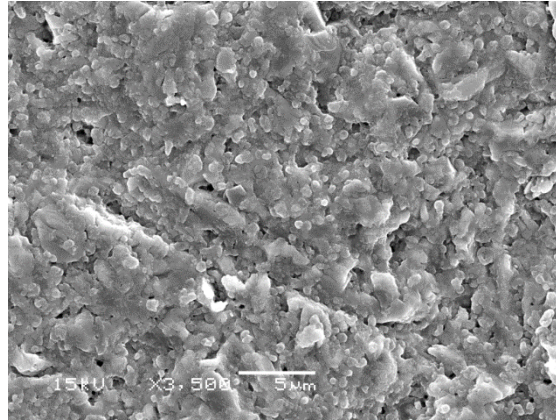


a-PDT

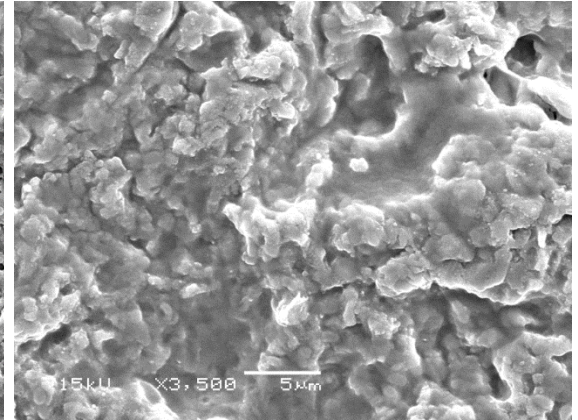
Fig 8



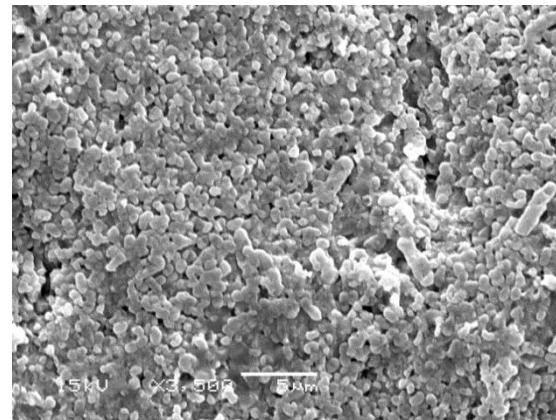
Sample



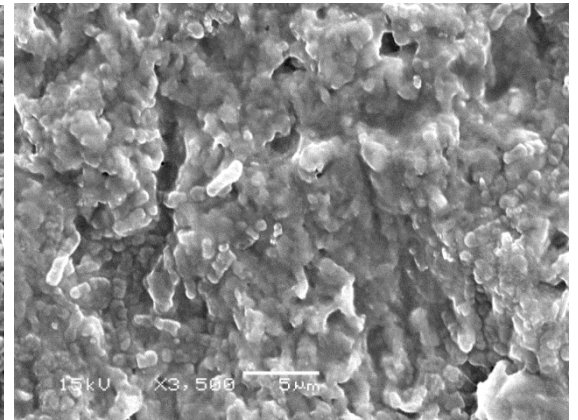
Control



MB



Laser



a-PDT

Fig 9

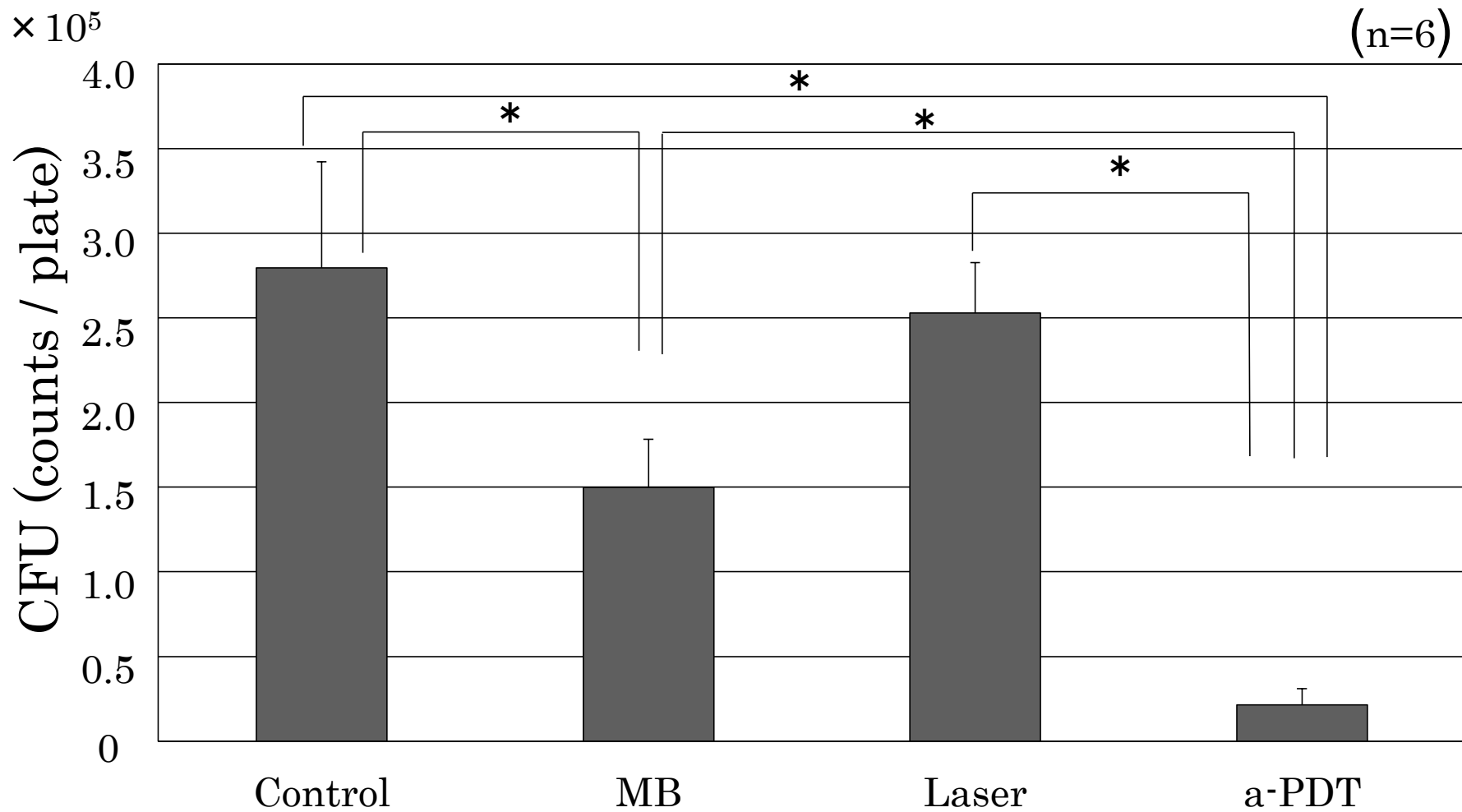


Fig 10

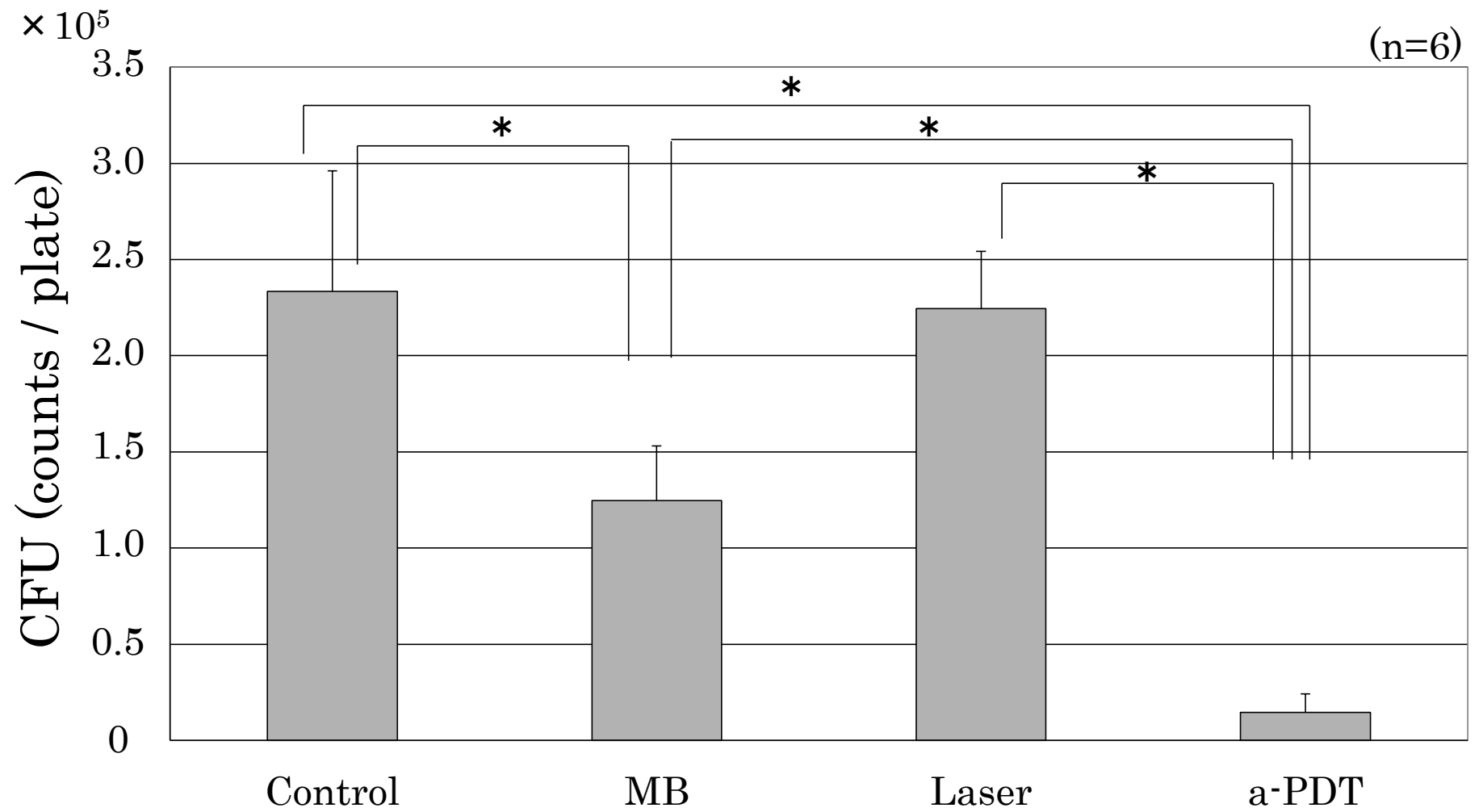


Fig 11

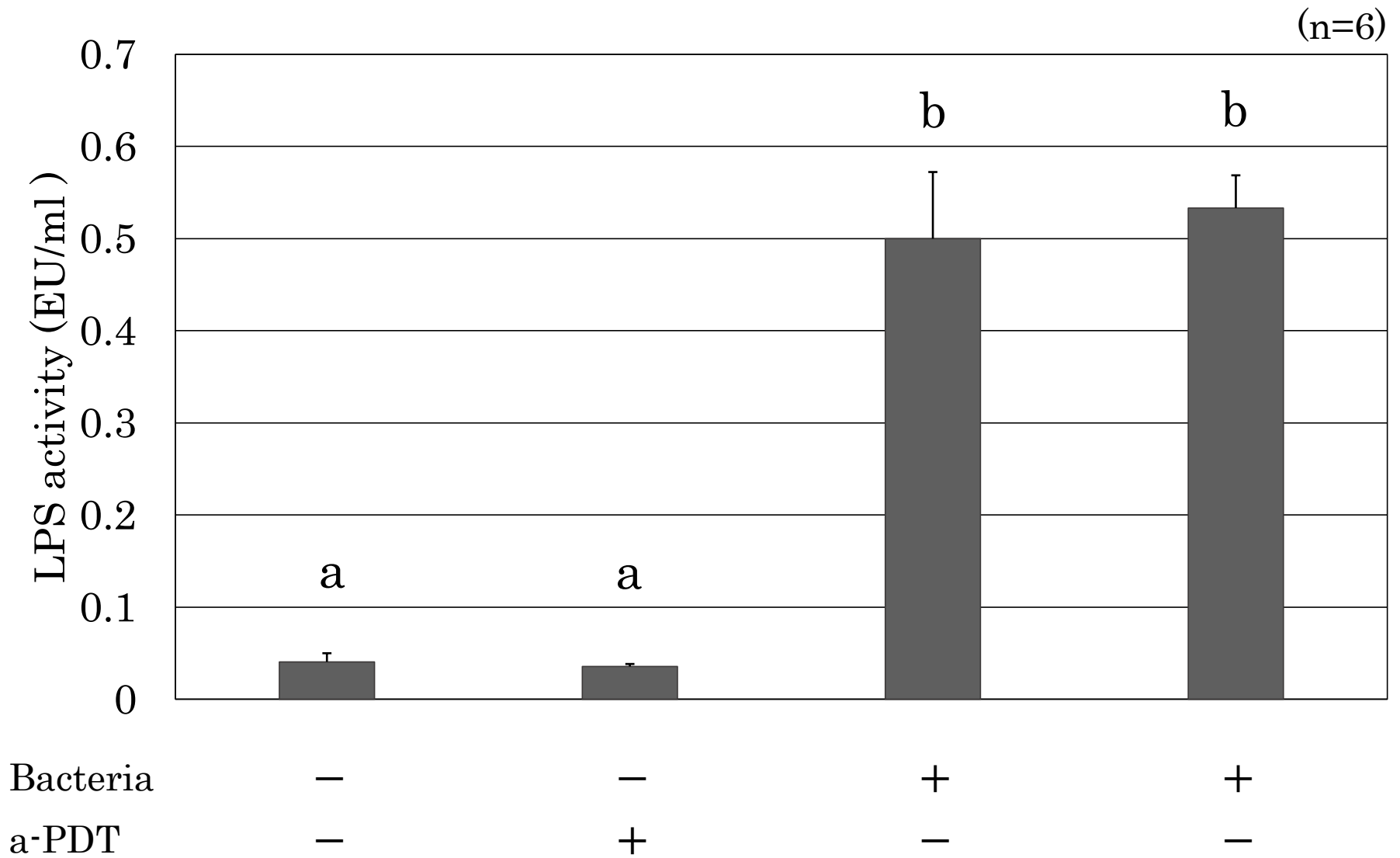




Fig 12

