

## Nd:YAG レーザーと TiO<sub>2</sub> による *in vitro* での殺菌効果

### 第2報：誘起衝撃応力が殺菌効果に与える影響

和 賀 正 明 古 本 達 明\*  
杉 原 成 良\*\* 上 田 隆 司\*

日本大学松戸歯学部微生物学講座

\*金沢大学理工研究域

\*\*杉原歯科クリニック東京都開業

(受付：2011年3月25日，受理：2011年6月29日)

## Combined Effect of Nd:YAG Laser and TiO<sub>2</sub> on Bactericidal Action (2nd report)

### —The Bactericidal Effect by Induced Dynamic Stress—

Masaaki WAGA, Tatsuaki FURUMOTO\*,

Naruyoshi SUGIHARA\*\* and Takashi UEDA\*

Department of Microbiological and Immunology, Nihon Universty

School of Dentistry of Matsudo

\*Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University

\*\*Sugihara Dental Clinic

(Received: March 25, 2011, Accepted for Publication: June 29, 2011)

**Abstract:** The bactericidal effects of an Nd:YAG laser by using a reaction mediator of TiO<sub>2</sub> are described. The laser beam was irradiated to the TiO<sub>2</sub> suspension through a quartz optical fiber, and the generated induced dynamic stress was observed in the TiO<sub>2</sub> particles which were absorbed by the laser beam. Our previous study demonstrated the bactericidal effect of an Nd:YAG laser due to thermal and induced dynamic stress. The aim of this study was to investigate the effect of different conditions of the Nd:YAG laser on induced dynamic stress. A pulsed Nd:YAG laser (STREAK-I ALTEK Co., Tokyo) and rutile type of TiO<sub>2</sub> powder (TIO12PB Kojundo Chemical Lab. Co., Ltd., Saitama) were used. *Streptococcus mutans* ATCC 25175 was used for this experiment. Bacterial cell suspensions of the strain were irradiated by Nd:YAG laser with several different pulsed energies and times of exposure, then the samples were subjected to SEM investigation. After these treatments, the viable cell count was estimated in each sample under different conditions. Regarding the bactericidal effects of the Nd:YAG laser in the presence of TiO<sub>2</sub>, there was a significant reduction such as 90-99.9% of viable cells of *S. mutans*. SEM (JSM-6390LV JEOL Ltd. Tokyo) investigations revealed morphological damage according to the pulse energies and exposure times applied. It is suggested that the bactericidal action occurred as a result of the dynamic stress induced by the Nd:YAG laser irradiation and TiO<sub>2</sub> as a reaction mediator.

(J. Jpn. Soc. Laser Dent. 22 : 77 ~ 84, 2011 Reprint requests to Dr. WAGA)

**Key words =** Nd:YAG laser, Bactericidal effects, TiO<sub>2</sub> powder, Induced dynamic stress

**キーワード =** Nd:YAG laser, 殺菌効果, TiO<sub>2</sub> 粉末, 誘起衝撃応力

## 緒 言

レーザー光は、医学歯学の様々な分野に応用され有益とされている<sup>1-3)</sup>。歯科の2大疾患であるう蝕と歯周病の進行には歯面に形成されるデンタルプラーク内の細菌が密接に関係している。これまで、歯科疾患の進行を助長する口腔細菌の増殖阻止や殺菌には様々な手法がとられてきた。その一つである半導体 TiO<sub>2</sub> の光触媒反応による *S. mutans* に対する殺菌効果が報告されている<sup>1)</sup>。レーザーを用いた殺菌効果については、今までにいくつか報告がなされている<sup>4)5)</sup>。これまでの殺菌のメカニズムとしては、熱的、化学的、物理的作用など諸説が報告されているが、殺菌作用のメカニズムを詳細に検討した報告は少ない。

筆者らは既に Nd:YAG レーザーと TiO<sub>2</sub> を用いた *in vitro* での殺菌効果において、Nd:YAG レーザー照射時に光触媒としてではなく、吸収反応剤として TiO<sub>2</sub> を用いて *in vitro* でのう蝕原細菌である *S. mutans* 及び *S. sobrinus* に対する殺菌効果を調べた結果、TiO<sub>2</sub> の存在下において Nd:YAG レーザー照射により生菌数が減少することを認めた<sup>16)</sup>。なお、この際に発生する衝撃応力波が細菌細胞を損傷させる一因であることが推測された。

本論文では、Nd:YAG レーザーと TiO<sub>2</sub> による *in vitro* での *S. mutans* ATCC25175 の殺菌効果の作用機序についてさらに検討するため、レーザー照射に起因して生じる誘起衝撃応力による効果に着目し、レーザー光の照射条件とレーザー照射に起因して生じる衝撃応力の条件を変えて殺菌効果を測定した。さらに他の粒子粉末との差違も検討し、いくつかの興味ある実験結果を得たので報告する。

## 使用材料および実験方法

### 1. 供試菌及び培地

実験に用いた供試菌は *S. mutans* ATCC25175 (日大松戸歯学部微生物学講座よりの提供) であり、Brain Heart Infusion broth (栄研科学 東京都 以下 BHI broth と略す) にて予め増菌培養した菌液について一定量を新たな BHI broth に接種し、37℃で48時間嫌気培養した。本実験は日本大学松戸歯学部の承認を得ている。

生菌数の測定にはこの培養液を適宜希釈し、MS 寒天培地を用いて通法に則り算定した。即ち滅菌生理食塩水 0.9ml に菌浮遊液 0.1ml を加え 10 倍希釈シリーズを作成し、各希釈段階の反応液から 0.1ml を汲み上げそれを MS 寒天培地に接種し 48 時間培養後に生じた集落数を測定した。

### 2. レーザー発振装置

本実験に用いたレーザー発振装置 (アルテック社製 STREAK-I 東京) は、Table 1 に示すように波長が  $\lambda = 1.064\text{nm}$  のパルス型 Nd:YAG レーザーである。レーザーパルス幅が 50 $\mu\text{s}$  から 400 $\mu\text{s}$  まで可変で、各パルス幅に

Table 1 Nd:YAG レーザー仕様

Laser (Nd:YAG laser)		
Wave length	$\lambda$	1064nm
Peak power	P	1-4 kW
Irradiation energy	E	50-990mJ
Pulse duration	$\tau$	50, 100, 200, 400 $\mu\text{s}$
Number of pulse	n	10
Optical fiber		
Core material		quartz
Diameter		400 $\mu\text{m}$

Table 2 粒子性状

粉末	TiO <sub>2</sub>	SiO <sub>2</sub>	MnO <sub>2</sub>	ZrO <sub>2</sub>
分子量	79.90	46.00	86.94	123.22
密度 kg/m <sup>3</sup>	4240	2651	5026	5560
融点℃	1870	1610	847	2900
沸点℃	2927	2950	—	4300
熱伝導率 W/m·K	6.53	1.55	—	1.95
熱容量 J/mol·K	55.06	44.46	54.05	56.23
屈折率	2.65	1.46	2.16	2.19
平均粒子径 $\mu\text{m}$	0.05-0.5	2.2	2.8	1
モース硬度	5-6.5	7.0	6.0	6.5

応じてレーザーエネルギーおよびピーク出力が設定可能である。発振されたレーザービームは、直径 400 $\mu\text{m}$  の石英ファイバーで伝送させて先端から出射する。

### 3. 反応剤と反応混合液

1) 本実験で使用した TiO<sub>2</sub> はルチル型であり光触媒作用は僅かであることが知られているが、その上安全性も考慮され TiO<sub>2</sub> 粉末表面が不活性なアルミナ (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) でコーティングされ、光触媒作用を含め化学反応性が抑えられている。

また比較対象として、二酸化ジルコニウム (ZrO<sub>2</sub>) 粉末 (株高純度化学研究所, ZRO02PB), 二酸化ケイ素 (SiO<sub>2</sub>) 粉末 (株高純度化学研究所, SIO07PB), 二酸化マンガン (MnO<sub>2</sub>) 粉末 (株高純度化学研究所, MNO02PB) を用いた。各粉末の物性値を Table 2 に示す。チタンおよびジルコニアはいずれも元素周期表の 4A 族、ケイ素は 4B 族、マンガンは 7A 族に属しており、いずれも原子価が +4 の酸化物系の粉末である。これらの粉末は常温で安定しているため取り扱いが容易である (Table 2)。

2) 蒸留水中に 1% (w/v) になるように TiO<sub>2</sub> を加え懸濁させ、この懸濁液 0.1ml に菌浮遊液 0.5ml を加え全量 0.6ml の 1% TiO<sub>2</sub> 反応混合液 (以下 1% TiO<sub>2</sub> 反応液と略す) を作製した。次に、蒸留水中に 10% (w/v) になるように TiO<sub>2</sub> を加え懸濁させ、この懸濁液 0.1ml に菌浮遊液

0.5mlを加え全量0.6mlの反応混合液（以下10% TiO<sub>2</sub>反応液と略す）を作製した。次に蒸留水中に20%（w/v）になるようにTiO<sub>2</sub>を加え懸濁させ、この懸濁液0.1mlに菌浮遊液0.5mlを加え全量0.6mlの反応混合液（以下20% TiO<sub>2</sub>反応液と略す）を作製した。

同様に酸化ジルコニウム（ZrO<sub>2</sub>）、二酸化ケイ素（SiO<sub>2</sub>）、二酸化マンガン（MnO<sub>2</sub>）のZr, Si, Mnがそれぞれの10%反応液を作製した。

#### 4. レーザー照射条件を変えた場合の生菌数減少に及ぼす影響

##### 1) 水槽温度

この実験には前回論文の結果から、反応液を試験管内に入れ水槽（ヨシダトーエイエンジニアリング社、TEC-10、神奈川、以下水槽と略す）中で加温した。水槽は攪拌しながら水温を測定し、各温度での生菌数の変化を調べた。なお温度測定には、KIMO社製温度計HD100を使用して温度を一定に保った。

2) レーザー照射条件が生菌数減少に及ぼす影響を調べるために以下の実験を行った。

10% TiO<sub>2</sub> 反応液0.6mlを試験管内に入れ、この反応液に光ファイバーを挿入し、プローブ先端から試験管底までの距離を2mmとし管中心部に固定した。①照射エネルギー300mJ/pulse、繰り返し速度10pps（以下300mJ-10pps）で100秒間（以下100s）・200秒間（200s）・300秒間（300s）照射し、生菌数の減少を測定した。②照射エネルギー600mJ-10ppsで100s・200s・300s照射し、生菌数の減少を測定した。③照射エネルギー900mJ-10ppsで100s・200s・300s照射し、生菌数の減少を測定した。

#### 5. 反応剤およびTiO<sub>2</sub>濃度を変えた場合の生菌数減少に及ぼす影響

1) 反応剤として、酸化ジルコニウム（ZrO<sub>2</sub>）、二酸化ケイ素（SiO<sub>2</sub>）、二酸化マンガン（MnO<sub>2</sub>）を用いた。それぞれの10%反応液0.6mlを試験管内に入れ、この反応液中に光ファイバーを挿入し、プローブ先端から試験管底までの距離を2mmとし、管中心部に固定した。照射エネルギー900mJ-10ppsで200秒間照射し、生菌数を測定した。

2) TiO<sub>2</sub>濃度が生菌数減少に及ぼす影響を調べるために以下の実験を行った。

1% TiO<sub>2</sub> 反応液0.6mlを試験管内に入れ、この反応液に光ファイバーを挿入し、プローブ先端から試験管底までの距離を2mmとし管中心部に固定した。照射エネルギー900mJ-10ppsで200秒間照射し、生菌数を測定した。10% TiO<sub>2</sub> 反応液、20% TiO<sub>2</sub> 反応液について同様の実験を行った。

#### 6. 菌体の走査電子顕微鏡観察

実験後の供試菌0.1mlをガラス上に採取し、通法により試料作製を行い固定後、イオンコーター（IB-2: Eiko En-

Table 3 各レーザー照射条件における殺菌効果

Laser condition	second	CFU/ml (Mean bacterial count)
300mJ-10pps	100s	$7.43 \times 10^7$
	200s	$3.57 \times 10^7$
	300s	$2.31 \times 10^6$
600mJ-10pps	100s	$3.31 \times 10^6$
	200s	$6.1 \times 10^4$
	300s	$2.32 \times 10^4$
900mJ-10pps	100s	$9.0 \times 10^5$
	200s	$3.57 \times 10^2$
	300s	0

(N = 9)

gineering, Co., Ltd.)で金蒸着後、走査電子顕微鏡（JSM-6390LVU、日本電子社、東京）で、加速電圧10～15KVで細菌の形態変化の有無を観察した。

### 実験結果

1. 生菌数減少に及ぼす温度並びにレーザー照射の影響  
前回同様、同一温度条件では、水槽温度の変化による生菌数の減少よりはレーザー照射による減少の方が、明らかに著明であった。

2. レーザー照射条件を変えた場合の生菌数減少に及ぼす影響

それぞれの照射条件における実験を9回行い生菌数の平均値を求めた。本実験の開始時、培養原液1ml中の生菌数は約 $10^8$ CFUであった。

1) 異なるレーザー照射条件が生菌数減少に及ぼす影響

①照射エネルギー300mJ-10ppsで100秒間照射後の生菌数は $7.43 \times 10^7$ CFU、200秒間照射後 $3.57 \times 10^7$ CFU、300秒間照射後 $2.31 \times 10^6$ CFUであった。

②照射エネルギー600mJ-10ppsで100秒間照射後 $3.31 \times 10^6$ CFU、200秒間照射後 $6.1 \times 10^4$ CFU、300秒間照射後 $2.32 \times 10^4$ CFUであった。

③照射エネルギー900mJ-10ppsで100秒間照射後 $9.0 \times 10^5$ CFU、200秒間照射後 $3.5 \times 10^2$ CFU・300秒間照射後0CFUであった（Table 3）。

3. 反応剤およびTiO<sub>2</sub>濃度を変えた場合の生菌数減少に及ぼす影響

1) 酸化ジルコニウム（ZrO<sub>2</sub>）、二酸化ケイ素（SiO<sub>2</sub>）、二酸化マンガン（MnO<sub>2</sub>）の10%反応液0.6mlに照射エネルギー900mJ-10ppsで200秒間（200s）照射し、生菌数の減少を測定した。それぞれ $1.0 \times 10^6$ CFU、 $3.7 \times 10^6$ CFU、 $2.8 \times 10^2$ CFUであった（Table 4）。

2) TiO<sub>2</sub>濃度を変えた場合の生菌数減少に及ぼす影響

1% TiO<sub>2</sub> 反応液0.6mlに照射エネルギー900mJ-10pps



Table 4 殺菌効果における反応剤の影響

	Control group (untreated)	900mJ-10pps 200s (Mean bacterial count)
ZrO <sub>2</sub>	1.0 × 10 <sup>8</sup> (CFU/ml)	1.0 × 10 <sup>6</sup> (CFU/ml)
SiO <sub>2</sub>	1.0 × 10 <sup>8</sup>	3.7 × 10 <sup>6</sup>
MnO <sub>2</sub>	1.0 × 10 <sup>8</sup>	2.8 × 10 <sup>2</sup>
TiO <sub>2</sub>	1.0 × 10 <sup>8</sup>	3.57 × 10 <sup>2</sup>

(N = 9)

Table 5 殺菌効果における TiO<sub>2</sub> 濃度の影響

Concentration (TiO <sub>2</sub> %)	Control group (untreated)	900mJ-10pps 200s (Mean bacterial count)
1	1.0 × 10 <sup>8</sup> (CFU/ml)	7.0 × 10 <sup>6</sup> (CFU/ml)
10	1.0 × 10 <sup>8</sup>	3.57 × 10 <sup>2</sup>
20	1.0 × 10 <sup>8</sup>	2.19 × 10

(N = 9)

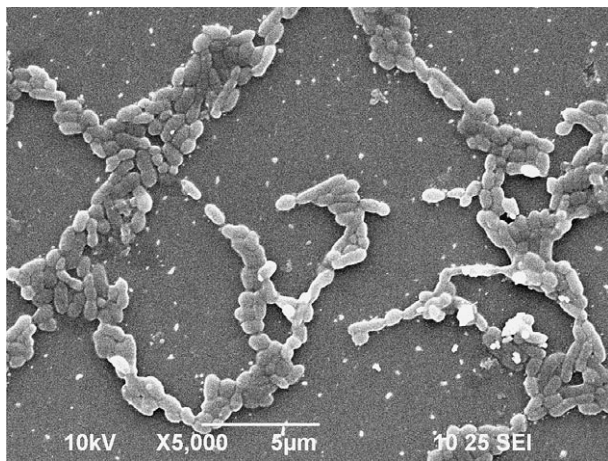


Fig. 1 未処理対照 *S. mutans* の SEM 像  
連鎖球菌特有の連鎖 wall band が認められ、構造的なダメージは認められず表面変化もなく菌特有の形態は維持されている。

で 200 秒間後の生菌数は  $7.0 \times 10^6$ CFU であった。同様に 10% TiO<sub>2</sub> 反応液, 20% TiO<sub>2</sub> 反応液においてそれぞれ  $3.57 \times 10^2$ CFU,  $2.19 \times 10$  CFU であった (Table 5)。

4. SEM による菌体の形態学的所見

Fig. 1 は試供菌である *S. mutans* の走査電子顕微鏡像 (以下 SEM 像と略す) である。wall band があり連鎖球菌特有の連鎖が認められる。構造的なダメージは認められず表面変化もなく菌特有の形態は維持されている。Fig. 2 は反応液に 300-10pps 100s でレーザー照射後の所見である。反応液中の TiO<sub>2</sub> と *S. mutans* は、多数の TiO<sub>2</sub> (粒子サイズ約 0.05-0.5µm) が密集して *S. mutans* 菌体 (径

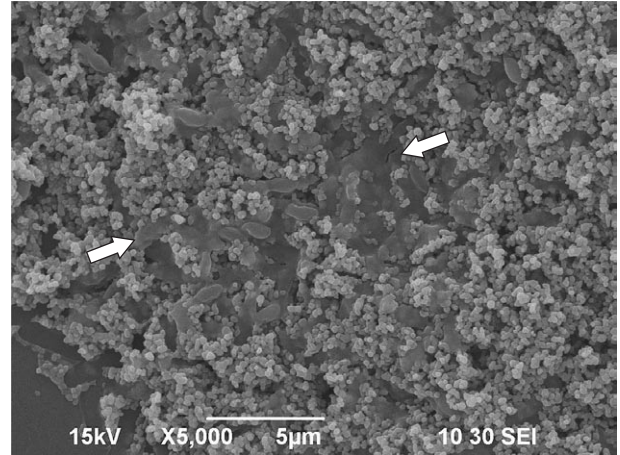


Fig. 2 300mJ-10pps 100s でレーザー照射後の所見  
反応液中の TiO<sub>2</sub> と *S. mutans* は、多数の TiO<sub>2</sub> (粒子サイズ約 0.05-0.5µm) が密集して *S. mutans* 菌体 (1 µm) はそれに埋入した状態であつ菌体の周辺に TiO<sub>2</sub> が凝集している。細菌構造は、細胞壁の輪郭が不明瞭な菌も見受けられる。

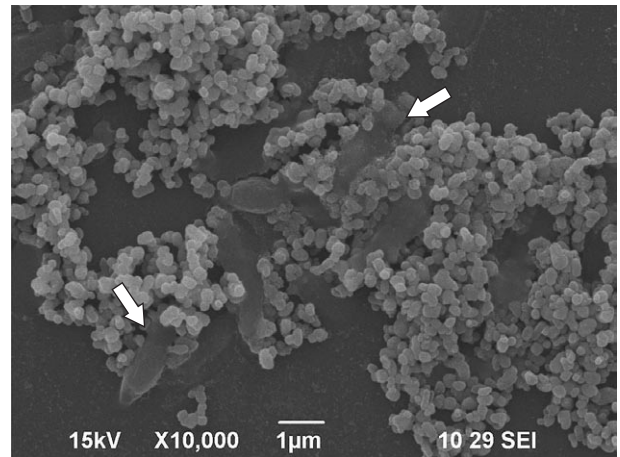


Fig. 3 600mJ-10pps 200s のレーザー照射後の菌の SEM 像  
菌数の減少と、菌体表面が融解し長軸方向に伸び、本来の 1 個ずつの独立した形態が失われ、融合し始めた形態変化が見られる。

1 µm) はそれに埋入した状態であつ菌体の周辺に TiO<sub>2</sub> が凝集している。我々のこれまでの報告によると、混合した直後から凝集を生じ沈下するため、遠心分離にかけても両者の分離はできなかった。その細菌構造は、細胞壁の輪郭が不明瞭な菌も見受けられる。Fig. 3 は 600mJ-10pps 200s のレーザー照射後の菌の SEM 像である。1 視野内の菌数の減少と、菌体表面が融解し長軸方向に伸び、本来の 1 個ずつの独立した形態が失われ、融合し始めた像が見られる。Fig. 4 は反応液に 900mJ-10pps 300s でレーザー照射後の SEM 像である。通常細菌細胞の形態は認められず、融解し形態が更に崩壊し無定形物質に変化した像が認

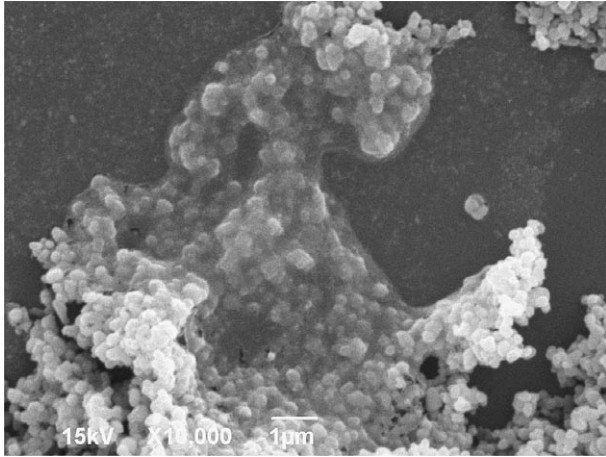


Fig. 4 900mJ-10pps 300s でレーザー照射後の SEM 像  
通常の細菌細胞の形態は認められず、融解し形態が崩壊し、無定形物質に変化した像が認められた。

められた。

### 考 察

近年歯科臨床において Nd:YAG レーザー照射時に半導体の一種である酸化チタン (TiO<sub>2</sub>) が光反応剤として用いられ、エナメル質の除去、象牙質の切削、歯質耐酸性の付与、歯肉切除・歯周ポケット内照射による殺菌などに効果があり臨床症状の改善に好成績を得ていることが報告されている。TiO<sub>2</sub> は地球上に豊富な元素として存在し、安全で無害なため光触媒として広く用いられ、熱的にも化学的にも安定したセラミックスである。また脱色にも効果があり、歯の漂白にも使用されてきた<sup>16)</sup>。

細菌への Nd:YAG レーザーによる殺菌効果については今までにいくつか報告がなされている。C.J. Whitters ら<sup>17)</sup> は、*S. mutans* にパルス型 Nd:YAG レーザーを照射条件 80mJ-10pps で 3 分照射後に 73.8%、120mJ-15pps、2 分照射後に 99.9% の殺菌効果があったことを報告している。しかし、殺菌のメカニズムについては推測の域を出ていない。Ward ら<sup>18)</sup> によると、*E. coli* を含む PBS 懸濁液中の *E. coli* に Nd:YAG レーザーを照射し 50℃ まで温度上昇することで、90% 以上の生菌数の減少を認めている。Nd:YAG レーザーによる殺菌効果の一部は加熱によるものと思われるが、さらに未解明のメカニズムが加わっている可能性があることを報告している。

筆者らは、これまでの研究で、TiO<sub>2</sub> 粉末を塗布した歯質表面にレーザー照射することにより TiO<sub>2</sub> 粉末にレーザーが吸収された表層は気化蒸散により損壊し、その際に衝撃応力が発生することを発見した<sup>19)</sup>。本実験で使用した TiO<sub>2</sub> はルチル型であり TiO<sub>2</sub> 粉末表面が不活性なアルミナ (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) でコーティングされ、光触媒作用を含め化

学反応性が抑えられている。厚さが 1 mm のアルミナで透過率を測定した結果、波長 1 µm 近辺ではアルミナは波長を透過し透過率が 10% になると報告<sup>20)</sup> されている。平均粒径が 1 µm 以下の酸化チタンにアルミナをコーティングした場合、その膜厚は、数十ナノメートル以下のオーダーになると推測される。本実験の場合、膜厚が薄い分、アルミナに対するレーザー光の透過率はさらに大きくなり、アルミナにはわずかしレーザー光が吸収されないため、アルミナは反応には影響を与えないと考えられる。

本実験は TiO<sub>2</sub> 反応液中でなされているが TiO<sub>2</sub> なしでレーザー照射すると、温度上昇も衝撃応力も生じない。1 ms 以下の短時間に、強力なピークパワーを発振するパルスレーザー光を照射すると、熱作用のほかに圧力の作用が生じ衝撃応力波が生じるとされている<sup>2)</sup>。

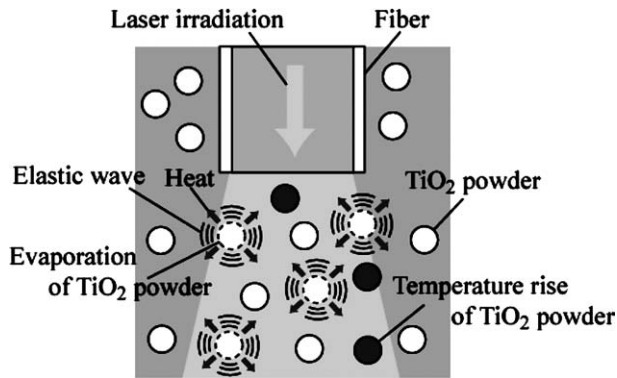
これまでの実験から、TiO<sub>2</sub> 反応液にレーザー照射すると、レーザーが反応中の TiO<sub>2</sub> 粉末に吸収され、急激に温度上昇することにより生じた熱によって水の温度が上昇し、さらに気化蒸散に伴う瞬間的な体積膨張によって応力波が発生し、それにより衝撃応力が発生したと考えられる。反応液中に存在する TiO<sub>2</sub> は水中に溶けずに存在する状態となり、発生する衝撃応力は大きくなると思われる (Fig. 5)。

筆者らは Nd:YAG レーザー照射時に TiO<sub>2</sub> を用いて *in vitro* での *S. mutans* 及び *S. sobrinus* に対する殺菌効果を調べた結果、TiO<sub>2</sub> の存在下において Nd:YAG レーザー照射により生菌数の減少を認めた。この時発生する衝撃応力波が細菌細胞を損傷させる一因と推測されたため、温度上昇を 50℃ まで抑制した条件下でレーザー照射をし、生菌数減少効果を検索したところ、恒温槽により 50℃ に加熱した場合の殺菌効果に比べ、明らかに Nd:YAG レーザーと TiO<sub>2</sub> を併用した場合に菌数の著しい減少が認められた<sup>16)</sup>。

さらに、われわれは、一次元弾性応力波理論<sup>21)</sup> に基づき、アルミニウムの丸棒材にひずみゲージを貼付した衝撃応力測定装置を考案し、各レーザー照射条件で得られた窩洞体積と衝撃応力との関係を調べた。レーザー照射によって生じた歯質表面の衝撃応力が大きくなるに従って窩洞体積が直線的に大きくなり、単位体積を除去するために必要な衝撃応力を求めたところ 180pa であった<sup>19)</sup>。さらに、レーザーエネルギーと誘起衝撃応力の関係を調べたところ、一パルスあたりのエネルギーが大きいほど衝撃力は大きくなる。かつピークパワーが大きいほど衝撃力は大きくなり、パルス幅 200µs、ピークパワー 4 kW において、TiO<sub>2</sub> 反応液中の誘起衝撃応力は 1100Pa であることを報告している<sup>22)</sup>。

Meral ら<sup>23)</sup> は Nd:YAG レーザーを用い反応液中の供試菌の殺菌効果には、細菌の種類やその数によってエネル



Fig. 5 TiO<sub>2</sub>懸濁液中の誘起衝撃応力発生メカニズム

ギの量は変える必要があることを報告している。

本研究においては、レーザー照射条件とレーザー照射に起因して生じる衝撃応力が生菌数減少に及ぼす影響を調べた結果から、殺菌効果は、レーザー照射エネルギーの上昇に伴い、誘起衝撃力が大きくなり、それにより殺菌効果が増加する。さらに衝撃応力数の増加に伴い殺菌効果が増加することも分かった。その結果、レーザーの1パルスのエネルギーと殺菌力は相関があること、総照射量にも相関があることが考えられた。菌数の減少率から考えると、本実験の開始時、培養原液1ml中の生菌数は約 $10^8$ CFUであったことから、 $10^6$ 個まで殺菌されれば、約99%の殺菌されたことになる。それを満たす照射条件は、300mJ-10ppsで300s、600mJ-10ppsで100sであり、この近辺に至適照射条件があることが推察された (Fig. 6)。

レーザー光の持つもう一つの可能性として、光線力学的治療が挙げられる。PDTは腫瘍に特異な集積性を持つ光感受性物質 (PS: photosensitizer) を投与し、その薬剤を励起させる特定波長のレーザーを局部照射することでおこなう治療法である<sup>24)</sup>。

歯科におけるPDTの研究は口腔外科領域が主として行われ、その後保存領域において、Nd:YAGレーザーを用いて、黒色系色素に吸収されやすい性質があることから、照射に際し照射面に墨等が塗布されてきた。これもある種のPDTということができよう。Ebiharaら<sup>25)</sup>はヒト単根管抜去歯に酸化チタン液浴下でNd:YAGレーザー照射を行い、レーザー照射前後のcontact-micro-radiography (CMR)像を観察したところ、CMR像上の根管の面積の増加を観察したと報告している。さらに、PDTによる殺菌効果<sup>26-28)</sup>においては、抗菌薬を用いるものとは異なり、耐性菌ができないと報告されている<sup>29,30)</sup>。他方、生体側にアレルギーが生じにくい可能性があり、口腔外科領域、歯内療法<sup>31)</sup>や、歯周治療<sup>32)</sup>へ応用されている。近年、PDTに用いるPSをナノサイズのキャリアーに取り込ませナノ粒子化することにより様々な有用性が得られることが報

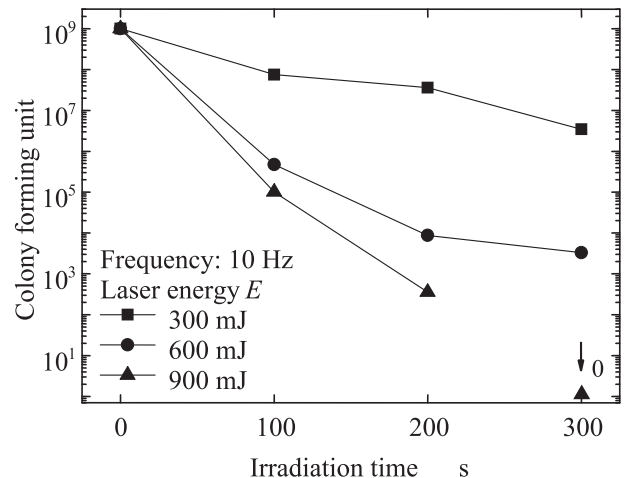


Fig. 6 殺菌効果と誘起衝撃応力の関係

告<sup>33)</sup>されている。

さらに、近年最少侵襲 (Minimal Intervention) という概念が浸透してきている。われわれも、初期う蝕にNd:YAGレーザー照射による最小侵襲処置の効果を報告<sup>34)</sup>している。治療にあたり健全な部分を可及的に傷つけず、患部組織のみに治療効果を与えるという概念をもとに行われるものであり、今後のますます医療での重要性は増すものと思われる。

本実験も広義のPDTと考えられる。そこでPSに相当する反応剤の違いによる衝撃応力の比較<sup>19)</sup>を行い、反応剤を塗布した歯質表面にレーザー照射したときの照射エネルギーと生じた衝撃応力との関係を調べたところ、衝撃応力は、TiO<sub>2</sub>乳液、薬用墨いずれの反応剤においても照射エネルギーの増加と共にその応力は大きくなった。また、薬用墨に対してTiO<sub>2</sub>乳液の方が各条件における衝撃応力が大きくその生じた衝撃応力は20~180Paであった。

二酸化マンガン (MnO<sub>2</sub>) 粉末の反応剤と、TiO<sub>2</sub>反応剤の誘起衝撃応力を比較すると、同一濃度ではMnO<sub>2</sub>の誘起衝撃応力が大きいことが分かった<sup>21)</sup>。

本実験において、照射エネルギー900mJ-10ppsで200秒後の生菌数において、ZrO<sub>2</sub>は $1.0 \times 10^6$ CFU、SiO<sub>2</sub>は $3.7 \times 10^6$ CFU、MnO<sub>2</sub>は $2.8 \times 10^2$ CFUとTiO<sub>2</sub>は $3.57 \times 10^2$ CFUと高い殺菌効果を示し、効果に大きな差が認められた。Nd:YAGレーザーは、黒系色素に吸収率が高く、従って黒色のMnO<sub>2</sub>粉末は他の白色粉末より、同一照射条件において吸収率が高いと推察された。そして、TiO<sub>2</sub>との間には殺菌力において大差はなかった。詳細は今後の研究に待ちたい。

TiO<sub>2</sub>濃度を変えた場合も、濃度の上昇に伴い誘起衝撃応力は上昇することが報告されている<sup>22)</sup>。本実験結果からも1% TiO<sub>2</sub>反応液0.6mlに照射エネルギー900mJ-10ppsで

200秒後の生菌数は照射  $7 \times 10^6$ CFUであったが、10% TiO<sub>2</sub> 反応液の場合は、 $3.57 \times 10^2$ CFU、20% TiO<sub>2</sub> 反応液の場合は、 $2.19 \times 10$ CFUとその減少は顕著であった。これはTiO<sub>2</sub>濃度の増加に伴い、レーザーを吸収し、蒸散した粉末量が増加したためだと考えられる。

### 3) SEMによる菌体の形態学的所見

細菌は原生生物に属する単細胞生物であり、核に核膜をもたない原核生物である。また細胞は硬い細胞壁をもつことを特徴としている。大きさは $0.5\mu\text{m}$ 以上であり、光学顕微鏡でその形態の特徴を捉える事ができる。しかし、細菌の微細構造は、電子顕微鏡を使わずに観察することはできない。細菌は基本構造として、細胞壁、核等をもつ。細胞壁は細菌が持つ固有の構造物で細菌の形態を一定に保つ働きをしている。ゆえにSEMによる細菌の細胞壁の形態変化を見ることは細菌の生死や活動を知る手掛かりとなるグラム陽性菌と陰性菌では菌体表層の構成成分と構造が著しく異なる。その主要構成成分であるペプチドグリカンはグラム陽性菌において、30～70%を占めており、その厚さは15～80nmの厚い層からなる。

試供菌である *S. mutans* のSEM像は、一個ずつの細菌は本来輪郭が明瞭な楕円形態して wall band があり、連鎖球菌特有の連鎖が認められる。反応液中のTiO<sub>2</sub>と *S. mutans* 菌は互いに凝集しあう。各条件によるレーザー照射後の菌体は、一パルスあたりのエネルギーが大きいほど衝撃力は大きくなり、衝撃力を与える回数増加に比例して、細胞壁の輪郭が不明瞭になり、菌数の減少と共に菌体表面が融解し長軸方向に伸び、ないしは形態が崩壊し、無定形物質に変化した像が認められた。

## 結 語

1. TiO<sub>2</sub> 反応液中でNd:YAGレーザー照射した場合に生じる衝撃応力が生菌数減少に及ぼす影響を調べた結果、レーザー照射エネルギーの上昇に伴い誘起衝撃応力が大きくなり、それにより殺菌効果が増加する。さらに衝撃応力数の増加に伴い殺菌効果が増加することが分かった。

2. 反応剤中のTiO<sub>2</sub>濃度の増加に伴い、誘起衝撃応力は上昇し、殺菌力は増加する。粉末の違いによる誘起衝撃応力を比較すると、同一濃度ではMnO<sub>2</sub>の誘起衝撃応力が大きく照射条件900mJ-10pps 200sにおいて、高い殺菌効果を示したが、TiO<sub>2</sub>と殺菌効果に大きな差が認められなかった。

3. SEM像から、レーザー照射後の菌体は、細胞壁の輪郭が不明瞭になり、菌数の減少と共に菌体表面が融解し長軸方向に伸び、ないしは形態が崩壊し、無定形物質に変化した像が認められた。レーザーの殺菌効果を裏付ける形態変化が示唆された。

## 文 献

- Morioka T, Saito T, Nara Y, et al: Antibactericidal action of powdered semiconductor TiO<sub>2</sub> on a serotype g *Streptococcus mutans*. Caries Res, 22 : 230-231, 1988.
- 渥美和彦：レーザー光の生体への影響，森岡俊夫編，レーザー歯学，第1版，東京，1986，医歯薬出版，46, 53-75.
- 加藤純二，栗津邦男，篠木 毅，他編：一からわかるレーザー歯科治療，東京，2003，医歯薬出版，5-7.
- 多々見敏明，尾上孝利，熊崎 護：Nd:YAGレーザーの口腔細菌におよぼす影響。日レ歯誌，1 : 11, 1991.
- Schultz RJ, Harvey GP: Bactericidal Effects of the Neodymium: YAG laser *in vitro* Study. Laser in Surgery and Medicine, 6 : 445-448, 1986.
- 菱本久美郎，桑原節子，川那辺純一，他：炭酸ガスレーザー照射による殺菌効果の生物物理学的研究。日本レーザー医学会誌，3 : 201-206, 1982.
- Rochd T, Calas P, Roques C: Evaluation of the Bactericidal Activity on Oral Organisms of the Nd:YAP Laser *In vitro*. Lasers Med Sci, 13 : 288-292, 1998.
- Schoop U, Kluger W, Moritz A, et al: Bactericidal effect of different laser systems in the deep layers of dentin. Laser in Surgery and Medicine, 35 : 111-116, 2004.
- Grönqvist A, Wiström J, Axner O, et al: Bactericidal effect of pulsed 1064nm Nd:YAG laser light on *Staphylococcus epidermidis* is of photothermal origin, an *in vitro* study. Laser in Surg Med, 27 : 336-340, 2000.
- Bergmans L, Moisiadis P, Teughels W, et al: Bactericidal effect of Nd:YAG laser irradiation on some endodontic pathogens *ex vivo*. Int Endod J, 39 : 547-557, 2006.
- 安藤嘉則，青木 章，渡辺 久，他：Er:YAGレーザーの歯周病原性細菌に対する殺菌効果。日歯周誌，35 : 374-381, 1993.
- Türkün M, Türkün LS, Celik EU, et al: Bactericidal effect of Er:Cr:YSGG laser on *Streptococcus mutans*. Dent Mater J, 25 : 81-86, 2006.
- 西方純一，平野泰之，伊藤公一，他：He-Neレーザーの *Streptococcus mutans* に対する殺菌効果ならびにその殺菌メカニズムの検討。日歯周誌，34 : 410-415, 1992.
- Lee BS, Lin YW, Chia JS, et al: Bactericidal effects of diode laser on streptococcus mutans after irradiation through different thickness of dentin. Lasers Surg Med, 38 : 62-69, 2006.
- 三枝敏敏，渡辺 聡，須田英明，他：半導体レーザー照射による根管内消毒効果。日レ歯誌，18 : 116-122, 2007.
- 和賀正明，上田隆司，古本達明，他：Nd:YAGレーザーとTiO<sub>2</sub>による *in vitro* での殺菌効果。日レ歯誌，19 : 10-16, 2008.
- Whitters CJ, Macfarlane TW, Mackenzie D, et al: The bactericidal activity of pulsed Nd:YAG laser radiation *in vitro*. Lasers in Medical Science, 9 : 297-303, 1994.
- Ward GD, Watson IA, Stewart-Tull DE, et al: Bactericidal action of high-power Nd:YAG laser light on *Escherichia coli* in saline suspension. J Appl Microbiol, 89 : 517-525, 2000.
- 古本達明，上田隆司，和賀正明，他：Nd:YAGレーザー照射時の誘起衝撃応力の測定—吸収剤の違いによる衝撃応力の変化—。日レ歯誌，20 : 67-73, 2009.
- Al Huda M, Hosokawa A, Ueda T, et al: Investigation of temperature at tool-chip interface in turning using two-color pyrometer Journal of Manufacturing Science and Engineering. Transactions of the ASME, 124 : 200-207, 2002.
- 柳原直人：一次元弾性応力は理論による衝撃力測定法。日本機械学会論文，43 : 4048-4052, 1977.
- Kasai A, Ueda T, Waga M, et al: Measurement of dynamic stress generated in TiO<sub>2</sub> solution, Induced by Nd:YAG laser

- beam irradiation. Proc of ICMT2010 : 337-341, 2010.
- 23) Meral G, Tasar F, Kocagöz S, et al: Factors affecting the antibacterial effects of Nd:YAG laser *in vivo*. Laser Surg Med, 32 : 197-202, 2003.
- 24) 酒井真理, 櫛引俊宏, 粟津邦男: 細胞形態の違いによる光線力学療法の違いの検討. JJSLSM, 30 : 405-414, 2010.
- 25) Ebihara A, Anjo T, Takeda A, et al: The surface of root canal walls irradiated by Nd:YAG laser with TiO<sub>2</sub>. Lasers in Dentistry X, SPIE, 5513 : 97-103, 2004.
- 26) Wood S, Nattress B, Kirkham J, et al: An *in vitro* study of the use of photodynamic therapy for the treatment of natural oral plaque biofilms formed *in vitro*. J Photochem Photobiol B, 50 : 1-7, 1999.
- 27) Wood S, Metcalf D, Devine D, et al: Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. J Antimicrobial Chemotherapy, 57 : 680-684, 2006.
- 28) Zanin ICJ, Lobo MM, Rodrigues LKA, et al: Photosensitization of *in vitro* biofilms by toluidine blue O combined with a light-emitting diode. Eur J Oral Sci, 114 : 64-69, 2006.
- 29) Wilson M: Bactericidal effect of laser light and its potential use in the treatment of plaque-related diseases. Int Dent J, 44 : 181-189, 1994.
- 30) Komerik N, Nakanishi H, MacRobert AJ, et al: In vivo killing of *Porphyromonas gingivalis* by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model. Antimicrob Agents Chemother, 47 : 932-940, 2003.
- 31) Soukos NS, Chen PS, Morris JT, et al: Photodynamic therapy for endodontic disinfection. J Endodon, 32 : 979-984, 2006.
- 32) Pfitzner A, Sigusch BW, Albrecht V, et al: Killing of periodontopathogenic bacteria by photodynamic therapy. J Periodontol, 75 : 1343-1349, 2004.
- 33) 永原絢子, 福田光男, 渡辺智久, 他: 半導体レーザーとインドシアニングリーン封入ナノ粒子による PDT 作用について. 日本歯周病学会, 第 51 回春季特別号, c-20 : 116, 2009.
- 34) 和賀正明, 杉原成良: ハイピークパルス Nd:YAG レーザー照射による初期齲蝕の最小侵襲処置について. 日レ歯誌, 14 : 131-138, 2003.