Yellow He-Ne レーザーによる口腔細菌 に対する殺菌効果

平野 泰之* 西方 純一 伊藤 公二
田中 憲二 伊藤 公一 村井 正大

*日本大学歯学部細菌学教室

(主任：林 邦雄教授)

日本大学歯学部保存学教室歯周病学講座

(主任：村井正大教授)

(平成5年6月16日受付)

Bactericidal Effect of Yellow He-Ne Laser Irradiation on Oral Bacteria

Yasuyuki HIRANO*, Jun-ichi NISHIKATA, Koji ITO,
Kenji TANAKA, Koichi ITO and Seidai MURAI

*Department of Bacteriology, Nihon University School of Dentistry

1-8-13, Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101, Japan

(Chief : Prof. Kunio HAYASHI)

Department of Periodontology, Nihon University School of Dentistry

(Chief : Prof. Seidai MURAI)

A study was conducted to examine the bactericidal effect of yellow He-Ne laser irradiation on oral bacteria, and to compare its bactericidal effectiveness with that of red He-Ne laser irradiation.

Streptococcus mutans, *Streptococcus sanguis*, *Actinomyces viscosus*, *Actinomyces naeslundii*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* were inoculated on the surface of agar plates and then exposed to light from a yellow He-Ne laser (trial manufacture, 2 mW, 594 nm, Osada Electric Co., Tokyo, Japan) in the presence of crystal violet (CV) as a photosensitizer. This yellow He-Ne laser emits yellow light, which has a CV absorption maximum at an extremely short wavelength (590

nm).

After laser irradiation, the plates were cultured aerobically or anaerobically, and the bactericidal effect was determined by the formation of a growth-inhibitory zone.

It was found that in the presence of CV (final concentration : 0.8 mg/l) the bactericidal effect of yellow He-Ne laser irradiation was more effective than that of the red He-Ne laser, killing requiring only 5 s. All six target organisms were equally sensitive to the yellow He-Ne light.

These findings suggest that the use of a yellow He-Ne laser may be effective in eliminating plaque bacteria, and that clinical application to periodontal treatment may be warranted.

Key words : Yellow He-Ne laser, Photosensitization, Crystal violet, Oral bacteria, Growth inhibition

要旨： レーザー波長 632.8 nm の Red He-Ne レーザーよりも短い波長、すなわち 594 nm の黄色可視光線を連続照射可能な Yellow He-Ne レーザー装置を用い、数種類の口腔細菌 (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Actinomyces viscosus*, *Actinomyces naeslundii*, *Porphyromonas gingivalis* および *Prevotella intermedia* の各 1 菌株、計 6 菌株) を供試し、殺菌効果が発現する CV 濃度およびレーザー照射時間について検討を加えた。

この結果、CV の存在下 (終末濃度 0.8 mg/l) で 5 秒間のレーザー照射から殺菌効果が認められ、これまでの研究で用いた Red He-Ne レーザーによる場合と比較して、その殺菌効果の著しい向上が認められた。また、供試した全ての菌株には、感受性の差異は認められなかった。これらの所見から、Yellow He-Ne レーザーの使用はブラク細菌の殺菌に有用であり、歯周治療において臨床応用が可能であると考えられる。

索引用語： Yellow He-Ne レーザー、光増感剤、クリスタルバイオレット、口腔細菌、増殖阻止

緒 言

現在、医学および歯学の領域で、レーザーを用いた治療がさまざまな形式で行われている。

これらレーザーのうち、低出力レーザーである He-Ne レーザー照射の生体に対する活性化効果として、疼痛の軽減ないし抑制、および創傷治癒の促進などの生体機能刺激効果がおこることが知られている。

一方、電磁波による殺菌効果に関しては、一般に紫外線照射によっては殺菌効果が発現するが、可視光線領域の光では殺菌効果が得られないことが知られてきた。

しかしながら、近年、適当な光増感剤を添加した条件下では、可視光線によっても殺菌効果が得られるという報告がいくつか認められる¹⁻³⁾。

最近、著者ら⁴⁾は He-Ne レーザーによる単色光の波長 632.8 nm の赤色可視光線照射による *Streptococcus mutans* に対する殺菌効果発現のメカニズムを解明し報告した。

すなわち、光増感作用を有する色素であるクリスタルバイオレットの存在下で、この色素が *Streptococcus mutans* 細胞に一定濃度で接している場合で、なおかつ酸素存在下であれば、632.8 nm のレーザー光照射を行うことによって殺菌効果が発現することを確認した。

本報告では、レーザー波長 632.8 nm の Red He-Ne レーザーよりも短い波長、すなわち 594 nm の黄色可視光線を連続照射可能な Yellow He-Ne レーザー装置を用い、数種類の口腔細菌を供試し、殺菌効果が発現する CV 濃度およびレーザー照射時間について検討を加えた。

材料および方法

1. He-Ne レーザー

使用した He-Ne レーザー装置は、Yellow He-Ne レーザー装置 (長田電機工業株式会社製作) で、プローブ先端部の平均出力が 2 mW、波長は 594 nm の黄色可視光線を連続照射可能なものである。

2. 供試菌株

供試菌株は、下記に示すとおり、すべて本学細菌学教室保存のものである。

ブラク構成細菌である *Streptococcus* 属の、*Streptococcus mutans* PS 14 株 (以後、*S. mutans* と略す) および *Streptococcus sanguis* ATCC 10556 株 (以後、*S. sanguis* と略す) を、また *Actinomyces* 属の、*Actinomyces viscosus* LY 7 株 (以後、*A. viscosus* と略す) および *Actinomyces naeslundii* ATCC 12104 株 (以後、*A. naeslundii* と略す) を、また、歯周病関連細菌として、*Porphyromonas gingivalis* 381 株 (以後、*P. gingivalis* と略す) および *Prevotella intermedia* ATCC 25261 株 (以後、*P. intermedia* と略す)。

以上の 6 菌種 6 菌株と供試した。

3. 培 地

使用した培地は、Brain Heart Infusion (Difco 社製、USA；以後、BHI と略す) 寒天培地、血液加 Trypticase Soy (Becton Dickinson 社製、USA；以後、TS と略す) 寒天培地および GAM 培地 (日水製薬社製、東京) である。

4. 試 薬

使用した色素は、クリスタルバイオレット (和光純薬社製、大阪；以後、CV と略す) である。

5. 実験方法

Streptococcus 属および *Actinomyces* 属においては、

CVを添加したBHI寒天平板上にBHI brothで37°C, 24時間培養の菌液0.5 mlを混釈したsoft agar (0.4%寒天, 2.5 ml;以後, 菌層と略す)を重層した平板を用いた。このBHI寒天培地に添加するCVは, *Mitis Salivarius*寒天培地処方濃度0.8 mg/lを基準濃度1倍とし, この濃度, およびこれの1/2, 1/5, 1/10 および1/20倍濃度の5条件を設定した。

一方, *P. gingivalis* および *P. intermedia* においては, 血液加TS寒天平板上にGAM brothで37°C, 48時間嫌気培養の菌液0.5 mlを混釈した菌層を重層した平板を用いた。また, この条件ではCVを菌層に添加し, この菌層に添加したCV濃度は前記の条件と同様の5条件とした。

レーザー照射は, 著者ら^{4,5)}および西方⁶⁾の一連の実験条件と同様にプローブを固定し, レーザー照射を行った。すなわち, 被照射面までの距離を5 mmに保ち, レーザー光が垂直に照射されるように設定した。

なお, レーザー被照射面のスポット径は約3 mmで

表1 クリスタルバイオレット加寒天培地での
S. mutans の増殖に及ぼす影響

照射時間 (秒)	クリスタルバイオレット濃度				
	1倍	1/2倍	1/5倍	1/10倍	1/20倍
30	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+
増殖阻止帯あり					+
増殖阻止帯あるが不明瞭					+
増殖阻止帯なし					+

(n = 2)

表2 クリスタルバイオレット加寒天培地での
S. sanguis の増殖に及ぼす影響

照射時間 (秒)	クリスタルバイオレット濃度				
	1倍	1/2倍	1/5倍	1/10倍	1/20倍
30	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+
増殖阻止帯あり					+
増殖阻止帯あるが不明瞭					+
増殖阻止帯なし					+

(n = 2)

あった。

レーザー照射条件は1枚の寒天平板において4条件とし, 被照射部のエネルギー密度が, それぞれ約0.15, 0.3, 0.6 および0.9 J/cm² となるように照射(5, 10, 20 および30秒間照射)後, ただちに, これらの平板を37°C, 48時間, 好気培養した。また, 嫌

表3 クリスタルバイオレット加寒天培地での
A. viscosus の増殖に及ぼす影響

照射時間 (秒)	クリスタルバイオレット濃度				
	1倍	1/2倍	1/5倍	1/10倍	1/20倍
30	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+
増殖阻止帯あり					+
増殖阻止帯あるが不明瞭					+
増殖阻止帯なし					+

(n = 2)

表4 クリスタルバイオレット加寒天培地での
A. naeslundii の増殖に及ぼす影響

照射時間 (秒)	クリスタルバイオレット濃度				
	1倍	1/2倍	1/5倍	1/10倍	1/20倍
30	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+
増殖阻止帯あり					+
増殖阻止帯あるが不明瞭					+
増殖阻止帯なし					+

(n = 2)

表5 血液加TS寒天培地での *P. gingivalis* の増殖
に及ぼす影響 (菌層にクリスタルバイオレット添加)

照射時間 (秒)	クリスタルバイオレット濃度				
	1倍	1/2倍	1/5倍	1/10倍	1/20倍
30	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+
増殖阻止帯あり					+
増殖阻止帯あるが不明瞭					+
増殖阻止帯なし					+

(n = 2)

表 6 血液加 TS 寒天培地での *P. intermedia* の増殖に及ぼす影響 (菌層にクリスタルバイオレット添加)

照射時間 (秒)	クリスタルバイオレット濃度				
	1 倍	1/2 倍	1/5 倍	1/10 倍	1/20 倍
30	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	-
増殖阻止帯あり : +					
増殖阻止帯あるが不明瞭 : +					
増殖阻止帯なし : -					

(n = 2)

気性菌においてはガス置換嫌気培養 (N₂ 95%, CO₂ 5%) を行った。

なお、被験試料の数は各条件において 2 個とした。

また、レーザー照射による殺菌効果は、寒天平板上での増殖阻止帯の有無をもって判定した。

成 績

Yellow He-Ne レーザー照射によって、供試したすべての菌株 (グラム陽性菌: *S. mutans*, *S. sanguis*, *A. viscosus*, *A. naeslundii*, グラム陰性菌: *P. gingivalis*, *P. intermedia*) において殺菌効果を認めた。

すなわち、CV 1 倍濃度 (0.8 mg/l) では全菌株において 5 秒間照射から、また 1/20 濃度でも全菌株において 30 秒間照射で殺菌効果を認め、いずれの菌株においても CV 濃度およびレーザー照射時間に依存した殺菌効果が認められた (表 1~6)。

また、菌株による感受性の差異は、ほとんど認められなかった。

考 察

西方⁶⁾および著者ら^{4,5)}は、波長 632.8 nm, 出力 10 mW の Red He-Ne レーザー照射による *S. mutans* に対する殺菌効果について報告している。この Red He-Ne レーザー照射による *S. mutans* 細胞に対する殺菌効果の発現には、色素である CV の存在下で、この色素が *S. mutans* 細胞に一定濃度以上で接している場合で、なおかつ酸素存在下であることが必須条件であることを結論として得ている (図 1)。また、こ

図 1 He-Ne レーザー照射によって殺菌効果が発現する条件

れらの報告の中で、CV の吸光特性の測定から、590 nm 付近にその最大吸収ピークを認めており、Red He-Ne レーザーの波長 632.8 nm は、この CV の最大吸収ピークからかなり離れたものであることが明らかにされているが、この赤色単色光のレーザー照射によっても、CV 濃度 1.6 mg/l 濃度で 30 秒間照射、すなわち 4.3 J/cm² のエネルギー密度から *S. mutans* に対する殺菌効果を認めている。

本報告では、使用したレーザー光は Yellow He-Ne レーザーであり、その波長は 594 nm で、CV の最大吸収ピーク 590 nm にほぼ等しい波長を有する黄色単色光を用いた。したがって、光増感剤としての CV の光吸収効率が高まり、その殺菌効果が飛躍的に高まることが期待された。

本実験結果では、CV 濃度 0.8 mg/l であっても全菌株において、わずか 5 秒間 (0.15 J/cm²) の照射から殺菌効果を認めた。このことは、この Yellow He-Ne レーザーの出力が 2 mW であることを考え合わせると、これまでの研究で用いた Red He-Ne レーザーによる殺菌効果^{4~6)}と比較して、予想されたとおり著明に殺菌効率が高まり、本レーザーの使用がきわめて有効に作用することが明白となった。

さらに、供試した菌種による感受性の差異も認められなかった。

炎症性歯周疾患は、歯頸部および歯肉縁下に形成されるプラークによって引き起こされ⁷⁾、このプラークは様々な歯周病関連細菌から構成されている^{8,9)}。したがって、これらの微生物を殺菌する試みが、古くから抗生剤を始めとした多くの抗菌剤を用いて試みられてきているが、いまだ臨床的に確実な応用法とはなっていない。また、高出力レーザー使用による、これらプラーク細菌殺菌への応用の試みもなされているが、熱作用による Nd:YAG レーザー¹⁰⁾では、その出力

が極めて大きいため歯周組織への照射によるその安全性には、大きな問題があると考えられる。高出力レーザーのNd:YAGレーザーとその出力を比較すれば、低出力レーザーであるHe-Neレーザーでは、その僅か数百分の1である。これらの安全性への問題点から、可視光を用いた低出力レーザーの歯科臨床への応用は、きわめて魅力的なアプローチであると思われる。とくに、このYellow He-Neレーザーの短時間(秒単位)の照射によって、種々の口腔細菌の殺菌が可能となった事実から、このレーザーの臨床応用が、プラークコントロールの一方法となる可能性が高まったと結論づけられる。

結 論

1. これまでに行った一連の研究結果と本研究から、Yellow He-Neレーザー照射による殺菌効果は、Red He-Neレーザーと同様に、添加するCV濃度とレーザー照射時間に依存して発現し、今回供試したすべてのグラム陽性および陰性菌に対して認められた。

2. Yellow He-Neレーザー照射による殺菌効率は、Red He-Neレーザー照射による場合と比較してきわめて高く、CV濃度0.8 mg/lの条件下で全菌株において5秒間照射から殺菌効果が認められた。

文 献

1) Okamoto, H., Iwase, T. and Morioka, T.: Dye-

mediated bactericidal effect of He-Ne laser irradiation on oral microorganisms. *Lasers Surg. Med.*, 12: 450-458, 1992.

- 2) Malik, Z., Hanania, J. and Nitzan, Y.: Bactericidal effects of photoactivated porphyrins-an alternative approach to antimicrobial drugs. *J. Photochem. Photobiol.*, 5: 281-293, 1990.
- 3) Spikes, J.D. and Jori, G.: Photodynamic therapy of tumours and other diseases using porphyrins. *Las. Med. Sci.*, 2: 3-15, 1987.
- 4) 平野泰之, 西方純一, 汐見 登, 岸田 修, 小幡純, 伊藤公一: He-Neレーザー照射による*Streptococcus mutans*に対する殺菌メカニズム. 日歯周誌, 35: 157-161, 1993.
- 5) 西方純一, 平野泰之, 伊藤公一, 高田 治, 成川勝一, 村井正大: 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.
- 6) 西方純一: クリスタルバイオレットとトリパンプルの存在下における*Streptococcus mutans*に対するHe-Neレーザーの殺菌効果. 日歯周誌, 35: 48-53, 1993.
- 7) Löe, H., Theilade, E. and Jensen, S.B.: Experimental gingivitis in man. *J. Periodontol.* 36: 177-187, 1965.
- 8) Slots, J. and Listgarten, M.A.: *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal diseases. *J. Clin. Periodontol.* 15: 85-93, 1988.
- 9) Moore, W.E.C.: Microbiology of periodontal disease. *J. Periodont. Res.*, 22: 335-341, 1987.
- 10) Middel, M. and Renton-Harper, P.: Lasers in dentistry. *Br. Dent. J.* 170: 343-346, 1991.

連絡先:

日本大学歯学部細菌学教室

〒101 東京都千代田区神田駿河台 1-8-13