(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4564596号
(P4564596)

(45)発行日　平成22年10月20日(2010.10.20)　(24)登録日　平成22年8月6日(2010.8.6)

(51)Int.Cl.		F I	
A61K 31/542	(2006.01)	A61K	31/542
A61K 31/14	(2006.01)	A61K	31/14
A61K 31/409	(2006.01)	A61K	31/409
A61K 41/00	(2006.01)	A61K	41/00
A61P 1/02	(2006.01)	A61P	1/02

請求項の数 5　(全 18 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号	特願平5-519088
(86)(22)出願日	平成5年4月30日(1993.4.30)
(65)公表番号	特表平8-503383
(43)公表日	平成8年4月16日(1996.4.16)
(86)国際出願番号	PCT/GB1993/000909
(87)国際公開番号	WO1993/021992
(87)国際公開日	平成5年11月11日(1993.11.11)
審査請求日	平成12年5月1日(2000.5.1)
審判番号	不服2007-33900(P2007-33900/J1)
審判請求日	平成19年12月17日(2007.12.17)
(31)優先権主張番号	9209379.8
(32)優先日	平成4年4月30日(1992.4.30)
(33)優先権主張国	英国(GB)
(31)優先権主張番号	9211138.4
(32)優先日	平成4年5月26日(1992.5.26)
(33)優先権主張国	英国(GB)

(73)特許権者　505367464
ユーシーエル　ビジネス　ピーエルシー
イギリス国　ダブリュー１ティー　４ティーピー　ロンドン，トッテンハム　コート　ロード　９７，ザ　ネットワーク　ビルディング
(74)代理人　100066692
弁理士　浅村　皓
(74)代理人　100072040
弁理士　浅村　肇
(74)代理人　100088926
弁理士　長沼　暉夫
(74)代理人　100140556
弁理士　新村　守男

最終頁に続く

(54)【発明の名称】レーザー治療

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

活性成分として光増感剤を含む組成物であって、

（ａ）口腔の組織あるいは口腔内の傷または病変部を光増感剤と接触させ、それによって当該組織、傷または病変部中の任意の病原性微生物に当該光増感剤を吸収させ、ここで、治療部位での当該光増感剤の濃度は水溶液中で０．００００１～０．０１％ｗ／ｖであり、かつ当該光増感剤は、

アリアノルスチールブルー（Ｂａｓｉｃ　Ｂｌｕｅ　９９；ＣＡＳ　６８１２３－１３－７）、

トルイジンブルーＯ（ｔｏｌｕｉｄｉｎｅ　ｂｌｕｅ　Ｏ）、

クリスタルバイオレット、

メチレンブルー、

アズレブルーセルト（ａｚｕｒｅ　ｂｌｕｅ　ｃｅｒｔ）、

アズレＢクロリド（ａｚｕｒｅ　Ｂ　ｃｈｌｏｒｉｄｅ）、

アズレ２（ａｚｕｒｅ　２）、

アズレＡクロリド（ａｚｕｒｅ　Ａ　ｃｈｌｏｒｉｄｅ）、

アズレＢテトラフルオロボーレート（ａｚｕｒｅ　Ｂ　ｔｅｔｒａｆｌｕｏｒｏｂｏｒａｔｅ）、

チオニン、

アズレＡエオシネート（ａｚｕｒｅ　Ａ　ｅｏｃｉｎａｔｅ）、

アズレＢエオシネート（ａｚｕｒｅ　Ｂ　ｅｏｃｉｎａｔｅ）、
アズレミックスシック（ａｚｕｒｅ　ｍｉｘ　ｓｉｃｃ．）、
アズレＩＩエオシネート（ａｚｕｒｅ　ＩＩ　ｅｏｃｉｎａｔｅ）、
ヘマトポルフィリンＨＣｌ（ｈａｅｍａｔｏｐｏｒｐｈｙｒｉｎ　ＨＣｌ）、
ヘマトポルフィリンエステル（ｈａｅｍａｔｏｐｏｒｐｈｙｒｉｎ　ｅｓｔｅｒ）、
アルミニウム二スルホン化フタロシアニン（ａｌｕｍｉｎｉｕｍ　ｄｉｓｕｌｐｈｏｎａｔｅｄ　ｐｈｔｈａｌｏｃｙａｎｉｎｅ）および
クロリンス（ｃｈｌｏｒｉｎｓ）から選ばれる、そして
（ｂ）このように光増感剤に接触させた当該組織、傷または病変部に当該光増感剤により吸収される波長でのレーザー光線を用いて照射し、ここで、レーザー照射の時間は１秒～５分であり、かつ光線投射量は５～３０Ｊ・ｃｍ$^{-2}$である、
ことにより、
（ｉ）慢性歯周炎を治療するために歯周嚢における病原性微生物の破壊、
（ｉｉ）炎症性歯周疾患を治療または防止するために、歯と歯肉との間の領域における病原性微生物の破壊、または
（ｉｉｉ）ＡＩＤＳ患者、易感染性患者または義歯性口内炎を有する患者における、口腔内カンジダ症の治療、
をするための、組成物。

【請求項２】
レーザー光線がヘリウムネオンガスレーザーからの光線または砒化ガリウムレーザーからの光線である、請求項１記載の組成物。

【請求項３】
レーザーが１～１００ｍＷの出力および１～１０ｍｍのビーム直径を有する、請求項１または２に記載の組成物。

【請求項４】
光増感剤が製薬的に許容できる水性担体中の溶液の形で使用される、請求項１～３のいずれか１項に記載の組成物。

【請求項５】
緩衝剤、溶液の張度を調節するための塩、酸化防止剤、保存料、ゲル化剤およびミネラル質再付加剤（ｒｅｍｉｎｅｒａｌｉｓａｔｉｏｎ　ａｇｅｎｔ）から選ばれた１種またはそれ以上の補助用成分をさらに含む、請求項４記載の組成物。

【発明の詳細な説明】
本発明は、炎症性歯周疾患およびむしばを包含する多くの口腔疾患においてあるいは傷感染においてそして口腔内の創傷または病変において、包含される微生物を殺すための光増感用化合物およびレーザー照射線の使用に関する。
炎症性歯周疾患はヒトの最も一般に広がっている疾患でありそしてその進んだ形態、慢性歯周炎は成人の歯が抜ける主な原因である。慢性歯周炎を治療する現在の方法は、原因組織を排除するために歯肉下のプラーク（ｐｌａｑｕｅ）を排除することを包含する：これは抗菌性薬化学療法によりしばしば補助的に行われる。プラークの機械的除去は決して十分に首尾よくいくものではなくそしてクロルヘキシジン（ｃｈｌｏｒｈｅｘｉｄｉｎｅ）およびテトラサイクリンのような抗菌性薬の長期間の使用、顕著には、薬剤を臨床的に効果を無くさせる耐性の発現、そして口腔内ミクロフローラ（ｍｉｃｒｏｆｌｏｒａ）の障害から生ずる困難性の多くの欠点がある。
また、従来の歯牙充てん前にそして他の形態の歯科手術中に、穿孔されたう食窩中の微生物を殺す必要がある。
口腔内の微生物を殺す必要がある他の状況は、化学療法による従来の治療が殆ど有効でない、ＡＩＤＳ患者、易感染性個人および義歯性口内炎を有する患者の、口腔内カンジダ症の場合である。
本発明者は口腔内の病原微生物を殺す方法を開発した。
したがって、本発明は、方法が口腔内の組織あるいは口腔内の傷または病変部に光増感用

化合物を適用しそして光増感用化合物により吸収される波長でのレーザー光線を用いて該組織、傷または病変部を照射することからなる、該組織あるいは該傷または病変部を消毒または滅菌する方法を提供する。
本発明はまた、
（ａ）口腔の組織あるいは口腔内の傷または病変部における任意の病原性微生物が光増感用化合物を吸収するように該組織、傷または病変部を該光増感用化合物と接触させ、そして
（ｂ）該組織、傷または病変部を、該光増感用化合物により吸収される波長でのレーザー光線で照射する、
ことにより、該組織あるいは該傷または病変部を消毒または滅菌するのに使用するための、薬剤の製造においての該光増感用化合物の使用を提供する。
治療される傷あるいは病変部は、任意の手術による傷、外傷誘発性の傷、病原性微生物により起こった病変あるいはそのような微生物に感染した傷または病変部であってよい。その処置は、感染に対する日常の予防措置としてあるいは傷または病変部のすでに診断された感染の特定の治療として傷または病変部を消毒または滅菌するために適用されてよい。
一面において、本発明は、方法が微生物に光増感用化合物を適用しそして該光増感用化合物により吸収される波長でのレーザー光線で該微生物を照射することを包含する、口腔内の病原性微生物を殺す方法を提供する。
さらに、本発明は
（ａ）微生物が光増感用化合物を吸収するように該微生物を該光増感用化合物と接触させ、そして
（ｂ）該微生物を、該光増感用化合物により吸収される波長でのレーザー光線で照射する、
ことにより口腔内の病原性微生物を殺すのに使用するための、薬剤の製造においての該光増感用化合物の使用を提供する。
本発明の好ましい面において、光増感用化合物およびレーザー照射をもちいての処置は、
（ｉ）慢性歯周炎を治療するために歯周嚢中の病原性微生物の殺微生物、
（ｉｉ）慢性歯周炎、歯肉炎、等を包含する炎症性歯周疾患を治療または防止するために歯と歯肉との間の領域（歯肉裂け目または歯肉縁）における病原性微生物の殺微生物、
（ｉｉｉ）充てんまえの穿孔う食損傷の消毒または滅菌、
（ｉｖ）むしばを治療または防止するための歯表面上のう食（むしば）原性微生物の殺微生物、
（ｖ）他の歯科手術処置における象牙質組織および（または）歯肉組織の消毒または滅菌、および
（ｖｉ）ＡＩＤＳ患者、易感染性患者または義歯性口内炎を有する患者における、カンジダ症の治療、
に適用される。
本発明に従って使用するための光増感用化合物は、本発明にしたがって計画された濃度で対象微生物に対して一般的に非毒性でありそして傷または病変部のまわりの組織に対して一般的に非毒性である。しかしながら、光増感剤が微生物に対して非毒性であるべき特別の必要性はない。さらに、口腔内のまわりの組織を光増感剤にさらすのが一般に短い期間でありそして高度に集中化されるので、これらの組織に対して幾分の毒性を有する化合物を使用することは、許容できるであろう。
本発明の方法において使用される光増感剤は可視スペクトルの赤色末端でのあるいはそれより長い波長でのレーザー光線を吸収できるのが好ましく、その理由は、そのようなレーザー光線が口腔組織のような傷または病変部のまわりの組織に、より良好に浸透できそして特に治療されるべき部位に存在する可能性のある血液に良好に浸透できるからである。
使用するために選ばれた光増感剤は生理学的条件下、正の電荷を有するのが一般に好ましく、その理由は、そのような光増感剤は対象微生物より一層容易に吸収されるからであり、しかし、本発明にしたがって細菌に対して有効であるフタロシアニンは負に荷電されて

いる。本発明にしたがって使用されることができる特定の光増感剤は：
アリアノルスチールブルー（ａｒｉａｎｏｒ　ｓｔｅｅｌ　ｂｌｕｅ）、
トルイジンブルー　Ｏ（ｔｏｌｕｉｄｉｎｅ　ｂｌｕｅ　Ｏ）、
トリプタンブルー（ｔｒｙｐｔａｎ　ｂｌｕｅ）、
クリスタルバイオレット、
メチレンブルー、
アズレブルーセルト（ａｚｕｒｅ　ｂｌｕｅ　ｃｅｒｔ）、
アズレＢクロリド（ａｚｕｒｅ　Ｂ　ｃｈｌｏｒｉｄｅ）、
アズレ　２（ａｚｕｒｅ　２）、
アズレＡクロリド（ａｚｕｒｅ　Ａ　ｃｈｌｏｒｉｄｅ）、
アズレＢテトラフルオロボーレート（ａｚｕｒｅ　Ｂ　ｔｅｔｒａｆｌｕｏｒｏｂｏｒａｔｅ）、
チオニン（ｔｈｉｏｎｉｎ）、
アズレＡエオシネート（ａｚｕｒｅ　Ａ　ｅｏｓｉｎａｔｅ）、
アズレＢエオシネート（ａｚｕｒｅ　Ｂ　ｅｏｓｉｎａｔｅ）、
アズレミックスシック（ａｚｕｒｅ　ｍｉｘ　ｓｉｃｃ）、
アズレＩＩエオシネート（ａｚｕｒｅ　ＩＩ　ｅｏｓｉｎａｔｅ）、
ヘマトポルフィリンＨＣｌ、
ヘマトポルフィリンエステル、
アルミニウム二スルホン化フタロシアニン（ａｌｕｍｉｎｉｕｍ　ｄｉｓｕｌ－ｐｈｏｎａｔｅｄ　ｐｈｔｈａｌｏｃｙａｎｉｎｅ）、
クロリンス（ｃｈｌｏｒｉｎｓ）、
のような染料および他の光増感用化合物を包含する。
これらの光増感剤の或るもの、とくにヘマトポルフィリン類はグラム陰性菌により十分に吸収されなくそしてグラム陰性菌に対して有効である光増感剤、すなわち染料を使用するのが好ましい。これらの中で、アルミニウム二スルホン化フタロシアニン、トルイジンブルー　Ｏ、アズレＢクロリドまたはメチレンブルーを使用するのが現在好ましい。
トリプタンブルーまたはクリスタルバイオレットの使用を避けるのが好ましい。本発明の特定の面において、ＨｅＮｅレーザーが使用される場合、使用される光増感剤は、トリプタンブルーおよびクリスタルバイオレット以外である。
本発明の特定の面において、光増感剤は微生物を標的としそして（あるいは）微生物による光増感剤の吸収はターゲット用部分（ｔａｒｇｅｔｉｎｇ　ｍｏｉｅｔｙ）に結合させて光増感剤を用いることにより高められる。ターゲット用部分は、微生物上の特定の結合剤のための任意の特定の結合用パートナー、たとえば、微生物により発現される表面抗原に対する抗体であってよい。別法として、ターゲット用部分は微生物により有効に吸収されることが知られている物質であってよい。光増感剤分子へのターゲット用部分の結合は従来技術の使用によって達成されることができる（特に、Ｆｒｉｅｄｂｅｒｇ，Ｊ．Ｓ．等によるＰ．Ｎ．Ａ．Ｓ．，Ｕ．Ｓ．Ａ，６１８第３８３頁～第３９３頁（１９９１）参照）。
レーザー光線は、もし必要または都合よければ、光ファイバあるいは治療されるべき部位に光を送るための既知の装置を用いてヘリウムネオン（ＨｅＮｅ）ガスレーザー又は砒化ガリウム（ＧａＡｓ）レーザーの様な任意の適当な源により提供されることが出来る。（６３２．８ｎｍでの）ＨｅＮｅガスレーザー光線は、それが口腔組織および血液への良好な浸透性を有しそして本発明において使用するのに特に適当である光増感剤により十分に吸収されるので、特に適当である。しかしながら、他の光増感剤／レーザー組み合わせが意図されることが出来そして当業者は病原性微生物、特に傷に感染するかあるいは口腔内に存在することが知られている微生物を殺すのに用いるために他の公知のレーザー源および光増感剤を容易に採用することが出来るだろう。
近赤外（ｔｈｅ　ｆａｒ　ｒｅｄ）（７００～８００ｎｍ）で発するレーザー、特に半導体レーザーがまた使用されることができる。そのようなレーザーが使用される場合、選ば

れた光増感剤は７００ｎｍまたはそれより長い吸収ピークを有しそしてそれ故に、“無色”であってよいがしかしメチレンブルーのような或る種の染料がまたこれらのレーザーとともに使用されることが出来る。
特に好ましい光増感剤／レーザー組み合わせは：
（ａ）ヘリウム／ネオンレーザー（波長６３２．８ｎｍ）とともにトルイジンブルー　Ｏ、
（ｂ）砒化アルミニウムガリウムレーザー（波長６６０ｎｍ）とともにアルミニウム二スルホン化フタロシアニン、
である。組み合わせ（ａ）はＨＩＶ－関連カンジダ症及び歯周疾患の治療に特に適用されることができる。組み合わせ（ｂ）はむしばの治療あるいは防止に特に適用されることができる。これらは本発明の特に好ましい面を形成する。
微生物を殺すのに必要とされる光増感剤の量およびレーザーの投射量は微生物および治療されるべき部位によって変化するだろう。しかしながら、口腔内に普通見い出されそして炎症性歯周疾患、むしばおよび他の歯科疾患に関連する代表的な微生物を、下に記載されるとおりに露光すると、微生物の満足すべき殺微生物を一般に提供することが分かった：
１．レーザー出力：１～１００ｍＷ、好ましくは、約２５ｍＷのＨｅＮｅレーザー、１～１００ｍＷ、好ましくは、約１５ｍＷのＧａＡｓレザー。
（注：ビーム直径の選択、露光時間およびレーザー／光増感剤組み合わせに対する微生物の感受性に関連してレーザー源が選択される。短い時間用にあるいは広い領域を照射するために非常に強力な源が使用されてもよいがしかし常に必要とされる眼の保護以外に特別の予防措置が避けられる事ができるように強力性がやや劣る源を使用するのが一般に好ましい。）
２．レーザービームの大きさ：１～１０ｍｍのビーム直径が口腔内において実施するために都合がよい。
３．レーザー照射時間：１秒～５分、好ましくは５秒～２分そして最も好ましくは約３０秒。
（注：これらの数量は、連続的に照射されるレーザービーム寸法に対応して、あるいは間欠的に照射されるならば、その領域の全体の照射時間に対応して、単一領域に適用する。治療されるべき領域がビーム寸法を超え、ビームを移動させることを必要とする場合、全体の治療時間は対応して増大されるだろう。）
４．光投射量：５～３０Ｊ・ｃｍ$^{-2}$、好ましくは１０～２０Ｊ・ｃｍ$^{-2}$そして最もこのましくは約１５Ｊ・ｃｍ$^{-2}$。
５．増感剤濃度：水溶液中０．００００１～１％ｗ／ｖ、好ましくは０．０００１～０．１％ｗ／ｖ、そしてさらに好ましくは０．００１～０．０１％ｗ／ｖ、たとえば０．００５％ｗ／ｖ。
治療の部位でそしてたとえば、唾液または血液のような体液で治療部位がおおわれている歯周嚢および傷の治療において、光増感剤濃度は、体液により希釈された後に、有効な濃度を達成されるように一層大きな濃度で光増感剤を適用することが必要であることに留意すべきである。
光増感剤溶液は、微生物にいくらかの光増感剤を吸収させそしてレーザー光線に一層感受性にさせることを可能にする時間の間、微生物に接触させたままにしておく。適当な時間は、一般に１秒～１０分、たとえば１０秒～２分、好ましくは約３０秒であるけれども、この時間は使用している特定の光増感剤および殺すべき対象微生物に依存して変更されてもよい。
好ましくは、光増感剤は、水、たとえば蒸留水または脱イオン水、好ましくは、発熱性物質の無い滅菌水または注射用水のような製薬的に許容できる水性担体中の溶液で光増感剤を含む製薬組成物の形で使用される。その組成物は緩衝剤、溶液の張度を調節するための塩、酸化防止剤、保存料、（グアル（ｇｕａｒ）およびその誘導体のような）ゲル化剤、等をさらに含んでよい。好ましくは、その組成物は０．００００１～１０％ｗ／ｖ、好ましくは１％ｗ／ｖまで、たとえば０．０００１～０．１％ｗ／ｖで光増感剤を含む生理学

的に緩衝化された等張水溶液の形態にある。本発明の特定の面において、本組成物はエナメル質および（または）象牙質および（または）歯肉組織の治療のために意図され、そして光増感用化合物および補助用成分のみばかりでなく、ミネラル質再付加剤（ｒｅｍｉｎｅｒａｌｉｓａｔｉｏｎ　ａｇｅｎｔ）もまた用いて配合される。そのような組成物は、レーザー照射により病原性微生物を殺すと同時に歯のエナメル質および（または）象牙質の強度を改良するのに歯周嚢、むしば損傷、等の治療において使用されることができる。ミネラル質再付加剤はそれ自体周知であり、そして例えばＰｅａｒｓ，Ｅ．Ｌ．Ｆ．およびＮｅｌｓｏｎ，Ｄ．Ｇ．Ａ．によるＣａｒｉｅｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　２２　ｐ３６２～３７０（１９８８）において記載されているような従来の方法において使用されている。

遊離基捕獲用材料および原子状酸素捕獲用材料（ｓｉｎｇｌｅｔ　ｏｘｙｇｅｎ　ｓｃａｎｖｅｎｇｉｎｇ　ｍａｔｅｒｉａｌ）の使用は、これらが微生物の光増感に干渉する傾向があるので、避けるべきであることに留意すべきである。

本発明に従えば、適当に希釈された光増感剤溶液は、創縁切除傷または損傷、たとえば穿孔されたむしば損傷または歯周嚢またはＣａｎｄｉｄａ　ａｌｂｉｃａｎｓに感染した粘膜表面のような、治療すべき部位に局所的に適用され、光増感剤溶液は、殺されるべき微生物が光増感剤の有効量を吸収するのに十分な時間の間、微生物と接触させたままにしておきそして次ぎに、治療されるべき部位の少なくとも一部分そして好ましくは全ての病原性微生物を殺すのに十分な時間の間、適当なレーザー照射線に治療されるべき部位を露光する。さらに、たとえばむしば損傷を充填するか傷を接合するその部位の治療が次ぎに行われてもよい。

本発明は今や次の例によって例示されようそしてそれらの例はいかなるやり方においても本発明の範囲を限定することを意図しない。それらの例は口腔内疾患において包含されそして傷に感染する代表的な属の微生物である種々の微生物を殺すために光増感剤およびレーザーの使用を示す。

例　１

材料および方法

レーザー

使用されたレーザーは７．３ｍＷの出力を有するヘリウム／ネオン（ＨｅＮｅ）ガスレーザー（日本のＮＥＣコーポレーション）であった。これは、６３２．８ｎｍの波長を有する、直径１．３ｍｍの照準線を正しく向けたビームで照射線を発した。

対象微生物

その研究において使用された微生物はＳｔｒｅｐｔｃｏｃｃｕｓ　ｓａｎｇｕｉｓ　ＮＣＴＣ　１０９０４、Ｐｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ　ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓ　Ｗ５０、Ｆｕｓｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｎｕｃｌｅａｔｕｍ　ＮＣＴＣ　１０５６２およびＡｃｔｉｎｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ａｃｔｉｎｏｍｙｃｅｔｅｍｃｏｍｉｔａｎｓ　Ｙ４であった。（子牛の）脳心臓浸出物（ＢＨＩ）寒天（Ｏｘｏｉｄ　Ｌｔｄ．）上で４８時間毎に継代培養されたＳ．ｓａｎｇｕｉｓ以外はすべてウイルキンスチャルグレン（Ｗｉｌｋｉｎｓ　Ｃｈａｒｇｒｅｎ）（ＷＣ）血液寒天（英国、ＢａｓｉｎｇｓｔｏｋｅのＯｘｏｉｄ　Ｌｔｄ．）上に毎週移すことにより維持された。

光増感剤

試験化合物は次ぎのとおりの化合物以外はすべて英国、ＰｏｏｌｅのＳｉｇｍａ　Ｌｔｄ．から得られた：

アリアベルダークブルー（Ａｒｉａｂｅｌ　ｄａｒｋ　ｂｌｕｅ）、

ＦＤＣブルー＃２、

アリアビットパテントブルー（ａｒｉａｖｉｔ　ｐａｔｅｎｔ　ｂｌｕｅ）、

アリアビットインジゴカルミン（ａｒｉａｖｉｔ　ｉｎｄｉｇｏ　ｃａｒｍｉｎ）、

アリアノルスチールブルー（ａｒｉａｎｏｌ　ｓｔｅｅｌ　ｂｌｕｅ）、

アリアビットブリリアントブルーＦＣＦ（ａｒｉａｖｉｔ　ｂｒｉｌｌｉａｎｔ　ｂｌｕｅ　ＦＣＦ）および

ウサセルトＦＤアンドＣブルー＃１および＃２（ｕｓａｃｅｒｔ　ＦＤ　ａｎｄ　Ｃ　ｂｌｕｅ　＃１　ａｎｄ　＃２）、
（以上すべて英国のＨｏｕｎｓｌｏｗのＷｉｌｌｉａｍｓ　Ｌｔｄ．から）；
アズレミックスチュアシック（ａｚｕｒｅ　ｍｉｘｔｕｒｅ　ｓｉｃｃ）、
および
アズレ　Ｂ
（スイスＢｕｃｈｓのＦｌｕｋａから）；
ブリリアントクレシルブルー（ｂｒｉｌｌｉａｎｔ　ｃｒｅｓｙｌ　ｂｌｕｅ）および
トリパンブルー（ｔｒｙｐａｎ　ｂｌｕｅ）
（英国、ＰｏｏｌｅのＢＤＨから）；
アルミニウム二スルホン化フタロシアニン
（ロンドン、インペリアルカレッジ、化学部のＤ．Ｐｈｉｌｌｉｐｓ教授からの贈呈）；
ヘマトポルフィリンエステル
（ＧｌａｓｇｏｗのＰａｉｓｌｅｙ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｌｔｄから）。

細菌生存力上へのレーザー光線の効果

試験微生物の幾つかのコロニーを滅菌塩水中に懸濁させそして渦をたたせて均質な懸濁液を得た。この懸濁液の部分（２．０ｍｌ）を塩水中の種々の濃度の試験化合物の溶液の部分（２．０ｍｌ）（あるいは対照の場合は塩水だけ）と混合しそしてサンプル（１．０ｍｌ）を寒天プレートの表面上に広げた。（１０分後に）過剰の液体を除去しそして３７℃でプレートを乾燥した。次ぎに、プレートを種々の時間の間レーザーに露光し、その次ぎに増殖が対照プレートに見ることができるようになるまでそれらを嫌気的ジャー中でインキュベートした。プレートを阻止域について調べそして次ぎに阻止域内に何らかの増殖が生じたかどうかを調べるために追加の７日間再インキュベートした。

Ｓ．ｓａｎｇｕｉｓおよびＡ．ａｃｔｉｎｏｍｙｃｅｔｅｍｃｏｍｉｔａｎｓの場合において、使用された媒体はＢＨＩであり、一方ではＰ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓおよびＦ．ｎｕｃｌｅａｔｕｍについては、これに０．０００１％（ｗ／ｖ）のメナジオン（ｍｅｎａｄｉｏｎｅ）および０．００１％（ｗ／ｖ）のヘミン（ｈａｅｍｉｎ）を補充した。細菌が試験化合物にさらされない対照プレートは対象微生物の生存力上にレーザー光線単独で何らかの影響を有したかどうかを調べるために供された。試験化合物それ自体により細菌の生存力上に何か有害な作用があるかどうかが、その化合物に予かじめさらされた細菌を入れているプレートの非照射部分を調べることにより確かめられた。

光増感活性についての化合物の選別

ＨｅＮｅレーザー光線への露光の後にＳ．ｓａｎｇｕｉｓの増殖を阻止するそれらの能力について２７の化合物が試験された。各々の化合物は０．１％および０．００１％（ｗ／ｖ）の濃度で試験されそしてレーザー光線への露光は、５、１０、３０および６０秒であった。

光増感剤の濃度を変化させることの効果

選別プログラムにおいて光増感剤として働くことを示した化合物をさらに検討するために選んだ。上記方法を用いて、Ｓ．ｓａｎｇｕｉｓの増殖上への、化合物の濃度および露光時間を変えることの効果を調べた。各々２、１０および３０秒の露光時間で、０．０００１５％（ｗ／ｖ）～０．０１％（ｗ／ｖ）の濃度範囲を用いた。

他の口腔細菌の光増感

最も期待できる化合物の幾つがが、ＨｅＮｅ光線による殺菌に対して、Ｐ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓ、Ａ．ａｃｔｉｎｏｍｙｃｅｔｅｍｃｏｍｉｔａｎｓおよびＦ．ｎｕｃｌｅａｔｕｍを感受性増大させるそれらの能力について試験した。

結果

対象微生物としてＳ．ｓａｎｇｕｉｓを用いる２７の試験化合物の最初の選別プログラムの結果を表１に示す。

これから、次の化合物が有効な光増感剤であったことが分かる：アリアノルスチールブルー（ａｒｉａｎｏｒ　ｓｔｅｅｌ　ｂｌｕｅ）、トルイジンブルーＯ、クリスタルバイオ

レット、メチレンブルー、チオニン、数種のアズレ光増感剤、ヘマトポルフィリンおよびヘマトポルフィリンエステル。殺微生物時間は５～６０秒の範囲にわたり、これは２．７５～３３Ｊ／ｃｍ^{2}のエネルギー投与量を表した。

Ｓ．ｓａｎｇｕｉｓが予かじめ試験化合物にさらされることなしに照射されたプレート上には殺微生物域が見られなかった。フタロシアニンの場合以外は試験化合物それ自体は試験された濃度でＳ．ｓａｎｇｕｉｓの増殖に明らかな効果を有しなかった。

表　1

試験化合物	露光時間（秒）	光増感剤濃度（％，ｗ／ｖ）	結果
ブリリアントブルーＦＣＦ	６０	０．１	－
アリアビットパテントブルーＶ	６０	０．１	－
ウサセルトＦＤアンドＣブルー＃１	６０	０．１	－
〃　＃２	６０	０．１	－
アリアノルスチールブルー	６０	０．１	＋
アリアベルタークォイズ	６０	０．１	－
アリアビットインジゴカルミン	６０	０．１	－
パテントブルーＶＲＳ	６０	０．１	－
トルイジンブルーＯ	５	０．０１	＋
クリスタルバイオレット	１０	０．０１	＋
メチレンブルー	１０	０．０１	＋
アズレブルーセルト	５	０．０１	＋
アジレＢクロリド	５	０．０１	＋
アズレ２	５	０．０１	＋
アズレＡクロリド	５	０．０１	＋
アズレＢテトラフルオロボーレート	５	０．０１	＋
チオニン	５	０．０１	＋
アズレＡエオシネート	５	０．０１	＋
アズレＢエオシネート	５	０．０１	＋
アズレミックスシック	５	０．０１	＋
アズレIIエオシネート	５	０．０１	＋
トリパンブルー	６０	０．１	－
ブロモクレゾールブルー	６０	０．０１	－
ガロシアニン	６０	０．０１	－
ヘマトポルフィリンＨＣ１	１０	０．０１	＋
ヘマトポルフィリンエステル	５	０．０１	＋
アルミニウム二スルホン化フタロシアニン	ＤＴ		

＋　＝　殺菌効果

－　＝　検出出来る殺菌効果なし

ＤＴ＝　S. sanguisに対して示された直接毒性

或る範囲の試験化合物にさらした後に、Ｓ．ｓａｎｇｕｉｓの生存上へのヘリウム／ネオンレーザーからの光線の効果が示される。正の結果（すなわち殺菌）の場合において、試験された光増感剤の最も低い濃度が、最も短い露光時間と組み合わせて提供される。負の結果（すなわち殺菌性無し）については、最も高い光増感剤濃度および最も長い露光時間が提供される。

予備選別プログラムから選ばれた最も期待出来る化合物の濃度を変化させての、Ｓ．ｓａｎｇｕｉｓ上への効果を次ぎに調べた。表２は、試験された光増感剤の中で、トルイジンブルー　Ｏ、アズレＡクロリドおよびチオニンは、Ｓ．ｓａｎｇｕｉｓを殺菌の誘導に最も有効であったことを示す。たとえばトルイジンブルー　Ｏの場合において、殺菌域は、０．０００３％（ｗ／ｖ）の濃度を用いて２秒間の照射の後の幾つかの実験において容易

に認められた。
試験された光増感剤の中で、トルイジンブルー、メチレンブルーおよびアズレＢクロリドが対象微生物のすべてに対して有効な唯一の場合であったことが表３から分かる。いっぱんに、Ｆ．ｎｕｃｌｅａｔｕｍおよびＡ．ａｃｔｉｎｏｍｙｃｅｔｅｍｃｏｍｉｔａｎｓは、使用された光増感剤の濃度および露光時間の条件下、Ｓ．ｓａｎｇｕｉｓおよびＰ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓよりも、殺菌に対して一層耐性であるように思えた。

表　2

光増感剤	濃　度（％，ｗ／ｖ）	露光時間 2秒	１０秒	３０秒
トルイジンブルーＯ	0．01	＋	＋	＋
	0．005	＋	＋	＋
	0．0025	v	＋	＋
	0．00125	v	＋	＋
	0．00063	v	v	＋
	0．00031	v	v	v
	0．00016	－	－	－
アズレＡクロリド	0．01	v	＋	＋
	0．005	v	＋	＋
	0．0025	v	＋	＋
	0．00125	v	v	＋
	0．00063	－	－	＋
	0．00031	－	－	－
クリスタルバイオレット	0．01	＋	＋	＋
	0．005	v	v	＋
	0．0025	v	v	＋
	0．00125	－	－	＋
	0．00063	－	－	v
	0．00031	－	－	－
チオニン	0．01	＋	＋	＋
	0．005	＋	＋	＋
	0．0025	＋	＋	＋
	0．00125	＋	＋	＋
	0．00063	v	＋	＋
	0．00031	－	＋	＋
	0．00016	－	v	＋
	0．00008	－	－	＋
アズレＢクロリド	0．01	－	＋	＋
	0．005	－	＋	＋
	0．0025	－	－	v
	0．0125	－	－	－

表　2（続き）

光増感剤	濃　度（%，w／v）	露光時間 2秒	10秒	30秒
アズレBフルオロボーレート	0．01	－	v	＋
	0．005	－	－	＋
	0．0025	－	－	v
	0．00125	－	－	－
メチレンブルー	0．01	＋	＋	＋
	0．005	－	＋	＋
	0．0025	－	－	＋
	0．00125	－	－	－
ヘマトポルフィリンエステル	0．01	＋	＋	＋
	0．005	＋	＋	＋
	0．0025	－	＋	＋
	0．00125	－	－	－
アルミニウム二スルホン化フタロシアニン	0．01	NT		
	0．005	NT		
	0．0025	－	＋	＋
	0．00125	－	＋	＋
	0．00063	－	＋	＋
アルミニウム二スルホン化フタロシアニン	0．00031	－	－	＋
	0．00016	－	－	＋
ヘマトポルフィリンHCL	0．01	－	＋	＋
	0．005	－	－	＋
	0．0025	－	－	－

＋　＝　殺菌効果

－　＝　検出出来る殺菌効果なし

v　＝　可変性結果

NT＝　この濃度でS. sanguisに対して光増感剤の直接毒性の故に、試験されなかった。

光増感用剤の種々の濃度での処理後、Ｓ．ｓａｎｇｕｉｓの生存上への照射時間の効果が示される。

表 3

光増感剤	露光時間(秒)	S. sanguis	A. actinomycet-emcomitans	F. nucleatus	P. gingivallis
トルイジン ブルー O	10	＋	v	＋	＋
(0.005%)	30	＋	＋	＋	＋
ヘマトポルフィリン HCL	10	＋	－	－	＋
(0.5mM)	30	＋	－	－	＋
クリスタルバイオレット	10	＋	－	－	v
(0.005%)	30	＋	－	－	v
チオニン	10	＋	－	－	－
(0.005%)	30	＋	－	－	－
アズレBクロリド	10	＋	v	＋	＋
(0.005%)	30	＋	v	＋	＋
メチレンブルー	10	＋	＋	＋	＋
(0.005%)	30	＋	＋	＋	＋
アルミニウムニスルホン	10	＋	－	－	＋
化フタロシアニン	30	＋	－	－	＋
(0.0025%)					
ヘマトポルフィリン	10	＋	－	－	＋
エスナル(0.005%)	30	＋	＋	－	＋

＋ ＝ 殺菌効果

－ ＝ 検出できる殺菌効果なし

ｖ ＝ 可変性結果

ある範囲の光増感剤にさらした後、ＨｅＮｅレーザーからの光線に対する種々の口腔内細菌の感受性が示される。

検討

この研究の結果、多くの化合物が幾つかの口腔細菌、グラム陽性菌およびグラム陰性菌の両方を、ＨｅＮｅレーザーからの光線による殺菌に感受性を増大させることが出来ることを示した。光増感剤の不存在下に細菌への照射は、これらの微生物の生存力への検出できる効果を有しなかったそして試験された濃度で光増感剤それ自体では殺菌効果を発揮しなかった。光増感活性を示す化合物の中で、レーザーにより発せられる照射線の波長（６３２．８ｎｍ）に最も近い吸収最大を有する化合物が最も有効なものの中に入っていた。これらはトルイジンブルー（６３２．２ｎｍ）及びアズレＡクロリド（６３２．４ｎｍ）を包含した。

本研究は、ヘマトポルフィリンＨＣｌおよびヘマトポルフィリンエステルがグラム陽性菌およびグラム陰性菌の両方を、ＨｅＮｅ光線による殺菌に感受性を増大させることができたことを示す。これらの化合物は６３２．８ｎｍでの光線の吸収性に乏しいので、この発見は驚くべきことである。

より新しい世代の腫瘍光増感剤の１つである、アルミニウム二スルホン化フタロシアニンがまた本研究においてグラム陽性菌およびグラム陰性菌の有効な光増感剤であることが分かった。しかしながら、一般に、腫瘍の光化学療法（ＰＣＴ）において使用するために開発された光増感剤はトルイジンブルー、チオニンおよび数種のアズレ光増感剤のような光増感剤より、ＨｅＮｅ光線による殺菌に感受性増大させるのに有効性が少なかった。

Ｓ．ｓａｎｇｕｉｓの光増感剤であると分かった１６の化合物の中に、トルイジンブルー、メチレンブルーおよびアズレＢクロリドはまた、Ｐ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓ、Ｆ．ｎｕｃｌｅａｔｕｍおよびＡ．ａｃｔｉｎｏｍｙｃｅｔｅｍｃｏｍｉｔａｎｓの有効な増感剤であることが判明した。０．００５％（ｗ／ｖ）の濃度で、これらの化合物はほんの３０秒間ＨｅＮｅ光線に露光の後に細菌を殺すことができた。これらの微生物は、歯肉炎および歯周炎を包含する多くの口腔感染に包含されるので、これらの結果は、本発明がそのよ

うな感染を治療するのに有効であることを意味する。さらに、そのような疾患の局所的性質はこれらを、治療のこの形態に特に順応させ、その理由は、その病変部が光増感剤をそして光線を容易に受けることが出来るからである。

例　2

６６０ｎｍの波長を有する砒化ガリウムレーザー（出力＝１５ｍW）をアルミニウム二スルホン化フタロシアニンと組み合わせて使用され、そしてＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｍｕｔａｎｓ、Ｓ．ｓｏｂｒｉｎｕｓ、Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｃａｓｅｉ、Ｌ．ｆｅｒｍｅｎｔｕｍおよびＡｃｔｉｎｏｎｙｃｅｓ ｖｉｓｃｏｓｕｓ（これらのすべては、むしばのなかに含まれている）に対して試験された。

実験方法論は、トリプトン大豆ブロスが塩水の代わりに用いられた以外は例１において使用された実験方法論に類似している。結果を表４に示す。

表　4

微生物	露光時間（秒）	光増剤濃度（％、w／v）	結　果
S. mutans	１５	０．０１	－
	３０	０．０１	－
	６０	０．０１	＋
	６０	０．００１	＋
S. sobrinus	３０	０．０１	＋
	１２０	０．００１	＋
L. casei	１５	０．０１	＋
	３０	０．００１	＋
L. fermentum	３０	０．０１	＋
	１２０	０．００１	＋
A. viscosus	１５	０．０１	＋
	３０	０．００１	＋

したがって、これらの微生物を殺すのに必要とされるエネルギー密度は（０．００１％の光増感剤濃度および１２０秒の露光時間について）２．８ｊ／ｃｍ^{2}までであった。

例　3

Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｅｎｔｅｒｉｔｉｄｅｓの致死光増感

Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｅｎｔｅｒｉｔｉｄｅｓの一夜培養物を造りそして塩水中に１／１０および１／１００に希釈した。各々に等容量の０．０１％（ｗ／ｖ）トルイジンブルー Ｏを加えそして各々の懸濁液の１．０ｍｌを栄養寒天プレートの表面に広げた。過剰の液を除きそして３７℃でプレートを乾燥した。次ぎに、プレートを３０秒および６０秒間、ＨｅＮｅレーザーからの光線に露光した。次ぎにそれらを一夜インキュベートしそして阻止域について調べた。

懸濁液の１／１０希釈液を用いて６０秒の照射の後に、阻止域が明らかに認められた。

例　4

Ｃａｎｄｉｄａ ａｌｂｉｃａｎｓの致死光増感

サボーラウド（Ｓａｂｏｕｒａｕｄ）ブロス中のＣａｎｄｉｄａ ａｌｂｉｃａｎｓの一夜培養物をつくりそして塩水中の等容量の種々の濃度のトルイジンブルー Ｏ懸濁液の一定分取部分に加えた。１．０ｍｌのこれらの懸濁液をサボーラウド（Ｓａｂｏｕｒａｕｄ）デキストロース寒天プレートに加え、過剰の液体を除去し、プレートを乾燥し、そして次ぎに種々の時間の間、７．３ｍWのＨｅＮｅレーザーからの光線に露光した。インキュベーションの後に、表５に示されるように阻止域が明らかに認められた。

表　5

染料濃度（％）	露光時間（秒） 15	30	45	60	120	180	240	300
０．１	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋
０．０１	－	－	－	＋	＋	＋	＋	＋
０．００１	－	－	－	－	－	－	－	－
０．０００１	－	－	－	－	－	－	－	－
０．００００１	－	－	－	－	－	－	－	－

＋　＝　阻止域が見られる

－　＝　阻止域が見られない

例　５

Ｃａｎｄｉｄａ　ａｌｂｉｃａｎｓの致死光増感

方法

１１mWの出力を有する砒化アルミニウムガリウム（ＧａＡｓ）ダイオード（ビーム直径＝９mm、波長＝６６０nm）を光増感剤アルミニウム二スルホン化フタロシアニン（ＡＤＰ）およびメチレンブルー（ＭＢ、Ｃ．Ｉ．５２０１５）と組み合わせて用いた。７．３mWの出力を有するヘリウム／ネオン（ＨｅＮｅ）ガスレーザー（日本ＮＥＣコーポレーション）（ビーム直径＝１．３mm、波長＝６３２．８nm）を、クリスタルバイオレット（ＣＶ、Ｃ．Ｉ．４２５５５）、トルイジンブルー　Ｏ（ＴＢＯ、Ｃ．Ｉ．５２０４０）、ジヘマトポルフィリンエステル（ＤＨＥ）およびチオニン（Ｃ．Ｉ．５２０００）と組み合わせて用いた。滅菌（子牛の）脳心臓浸出物（ＢＨＩ）ブロスで１：１００に希釈されたＣ．ａｌｂｉｃａｎｓの一夜培養物の５０μｌ分取部分を井戸型微小滴定プレートに移しそしてＢＨＩ中の光増感剤の等容量の溶液を各々の井戸型プレートに加えて、０．１、０．５または１．０ｍｇ／ｍｌのいずれかの最終濃度を得た。室温で５分インキュベーションの後に、（おだやかにかきまぜられた）同じ２つの部分からなる井戸型プレートを１２０秒間、レーザーからの光線に露光した。染料溶液の代わりにイースト懸濁液プラスＢＨＩを含有する対照井戸型プレートを同一の方法で処理した。上記と同じ別の４つの井戸型プレートを造りそしてこれらはレーザー光線に露光しなかった。適当な井戸型プレートの照射の後に、生存菌の生菌数算定により調べた。

これらの実験に基づいて、最も期待できる光増感剤を選び、そしてイースト細胞の一層濃い懸濁液を殺すのを誘発するそれらの有効性が調べられた。その実験計画は一夜イースト培養物を１：１００ではなくて１：１０に希釈しそして各々の染料を０．１ｍｇ／ｍｌの濃度で使用した以外は上に略述したとおりであった。

結果

ＴＢＯ、レーザー光線およびその両方の組み合わせに露出させることの、Ｃ．ａｌｂｉｃａｎｓの生存力上への効果を表６に示す。１２０秒間、ＨｅＮｅ光線への露光はイーストの生存力への統計的に有意な効果を有しなかった（スチューデンツｔ－テスト（Ｓｔｕｄｅｎｔ’ｓ　ｔ－ｔｅｓｔ）、ｐ＞０．０５）。しかしながら、ＨｅＮｅレーザー光線不存在下での、０．１および０．５ｍｇ／ｍｌの濃度でのＴＢＯはそれぞれ２０．１％および２３．９％だけ、微生物の懸濁液の生菌数を減少させた。ＴＢＯの存在下に１２０秒間、ＨｅＮｅ光線（エネルギー投与量＝６６．３Ｊ／ｃｍ^{2}の密度で０．８８Ｊ）でイースト懸濁液を照射した場合、生菌数に統計的に有意な減少があった。染料濃度を増大させる

につれて、殺された微生物の数は増大し、０．１および０．５ｍｇ／ｍｌの濃度でそれぞれ６４．１％および６９．６％になった。
ＨｅＮｅレーザー光線の不存在下に、チオニンは０．１および０．５ｍｇ／ｍｌの濃度でイースト生存力への統計的に有意な効果を有しなかった（表６）。しかしながら、チオニンの存在下に１２０秒間、ＨｅＮｅ光線でイーストを照射すると、生存力において統計的に有意な減少を生じた。
ＨｅＮｅレーザーからの光線あるいは０．１および０．５ｍｇ／ｍｌの濃度でのＣＶはイーストの生存力上への統計的に有意な効果を有しなかった。しかしながら、イーストが該染料の存在下にＨｅＮｅ光線で照射された場合、生存力における統計的に有意な減少が達成された。
２．５ｍｇ／ｍｌほども高い濃度でのＤＨＥは露光時間が３６０秒ほども長かった場合でさえ、Ｃ．ａｌｂｉｃａｎｓをＨｅＮｅレーザー光線により殺菌することに対して感受性を増大することは出来なかった。
単独で用いた場合、ＨｅＮｅ光線または０．１ｍｇ／ｍｌのＴＢＯは、一層濃いイースト懸濁液の生存力上に有意な効果を有しなかった（表６）。しかしながら、０．１ｍｇ／ｍｌのＴＢＯの存在下にＨｅＮｅレーザー光線への微生物の露光は生菌数に有意な減少を生じた（ｐ＜０．０００１）。０．１ｍｇ／ｍｌの濃度でチオニンはレーザー光線の不存在下にイーストに毒性であった。一層濃厚なイースト懸濁液が該染料の存在下に１２０秒間ＨｅＮｅ光線に露光された場合、生菌数においてずっと大きな減少が得られた。
０．１ｍｇ／ｍｌのＣＶはレーザー光線の不存在下にイーストに対して毒性であるが、しかし該染料で処理された懸濁液が１２０秒間、ＨｅＮｅレーザー光線で照射された場合、生菌数における大きな減少が達成された（表６）。
１２０秒間、ＧａＡｓレーザーからの光線への露光（エネルギー投与量＝２．０４Ｊ／ｃｍ^{2}の密度で１．３２Ｊ）はＡＤＰの不存在下にイースト生存力上に統計的に有意な効果を有しなかった。ＡＤＰは１．０ｍｇ／ｍｌの濃度でイーストに毒性であり、４３．５％の生菌数の減少で有意な減少（ｐ＝０．００２）を生じた。しかしながら、０．１ｍｇ／ｍｌのＡＤＰはイースト生存力上への有意な影響を有しなかった。１．０ｍｇ／ｍｌのＡＤＰの存在下にイースト懸濁液はＧａＡｓレーザーからの光線で照射した場合、得られた生菌数は照射されていない、染料の存在しない対照の生菌数より非常に低かった。しかしながら、照射された染料処理懸濁液の生菌数と照射されていない染料処理懸濁液との間には有意差はなかった。
ＧａＡｓレーザー光線の不存在下にＭＢはＣ．ａｌｂｉｃａｎｓに対して毒性であった。０．１および１．０ｍｇ／ｍｌの濃度で、イースト懸濁液の生菌数はそれぞれ１６．９％および３５．２％だけ減少した。該染料の存在下に、１２０秒間イーストをＧａＡｓからの光線に露光した場合、生菌数はレーザー光線の不存在下に該染料での処理から生ずる生菌数より非常に低かった。該染料がそれぞれ０．１および１．０ｍｇ／ｍｌの濃度で使用された場合、減少は、４２．１％および５９．４％になった。ＧａＡｓレーザーからの光線が該染料の不存在下に使用された場合、イーストの生存力への有意な効果は有しなかった。
これらの結果は、Ｃ．ａｌｂｉｃａｎｓがいったん適当な光増感剤で処理されたならば、その微生物を低い出力のレーザーからの光線への短時間露光により殺すことが出来ることを示す。ＨｅＮｅレーザーの場合において、ＴＢＯが最も有効な増感剤であり、一方ではＧａＡｓレーザーが使用される場合、ＭＢが最も有効であった。

表 6

光増感剤	光増感剤濃度（ｍｇ／ｍｌ）	生菌数における減少（%） D－L＋	D＋L－	D＋L＋
(a) C. albicans の一夜培養物の 1/100希釈液を使用				
ＴＢＯ	０．１	ＮＳ	２０．１	６４．１
	０．５	ＮＳ	２３．９	６９．６
チオニン	０．１	ＮＳ	ＮＳ	２９．５
	０．５	ＮＳ	ＮＳ	３９．９
ＣＶ	０．１	ＮＳ	ＮＳ	７９．５
	０．５	ＮＳ	ＮＳ	９０．６
(a) C. albicans の一夜培養物の1/10希釈液を使用				
ＴＢＯ	０．１	ＮＳ	ＮＳ	７７．４
チオニン	０．１	ＮＳ	１２．８	６９．４
ＣＶ	０．１	ＮＳ	３．１	２１．８

Ｄ－Ｌ＋ ＝ 染料不存在下にレーザーに露光された

Ｄ＋Ｌ－ ＝ 染料にさらされたが、レーザーに露光されなかった

Ｄ＋Ｌ＋ ＝ 染料の存在下にレーザーに露光された

ＮＳ ＝ レーザーにも露光されず、染料にもさらされない対照培養物との有意差無し

Ｃ．ａｌｂｉｃａｎｓの懸濁液の生存力上へのＨｅＮｅレーザーからの光線の効果が示される。

例 6

インビトロ使用のモデル

歯肉下プラークサンプルの致死光増感

例５の実験計画に類似の実験計画を用いて、慢性歯周炎を有する２０人の患者からの歯肉下プラークサンプルを、光増感剤として５０μｇ／ｍｌのトルイジンブルー Ｏの存在下にそしてそれの不存在下に、３０秒間７．３mWのＨｅＮｅレーザーからの光線に露光した。種々の選択および非選択の媒体を用いての照射まえおよび照射後に種々のグループおよび種の細菌の生菌数算定が行われた。照射された３０μｌの分取部分中に始めに存在する生きている細菌の中央数値は１．１３ｘ１０^{5}ｃｆｕ（好気性菌）、４．０８ｘ１０^{5}ｃｆｕ（嫌気性菌）、４．９２ｘ１０^{3}ｃｆｕ（黒色着色の嫌気性菌）、４．７５ｘ１０^{2}ｃｆｕ（Ｐｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓ）、６．１５ｘ１０^{3}ｃｆｕ（Ｆｕｓｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｎｕｃｌｅａｔｕｍ）および１．７ｘ１０^{4}ｃｆｕ（ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｉ）であった。染料／レーザー組み合わせはこれらの微生物の生存力における有意な減少を達成し、生菌数における中央パーセンテージ減少は、好気性菌について９１．１%、嫌気性菌について９６．６%、黒色着色の嫌気性菌、Ｐ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓおよびＦ．ｎｕｃｌｅａｔｕｍについては１００%そしてｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｉについては９４．２%であった。全体として、２０のプラークサンプルにおける細菌の生存力は染料単独だけによっては有意に減少しなかった。これは、これらの微生物が慢性歯周炎を有する患者の高度に複雑な歯肉下ミクロフローラ（ｍｉｃｒｏｆｌｏｒａ）特性の構成部分として存在する歯周病原性細菌の致死光増感を達成することが出来ることを示す。

例 7

インビボ使用のモデル

象牙質により遮蔽されている場合またはコラーゲンマトリックス中に埋め込まれている場

合の、う食（むしば）原性菌の致死光増感
この研究の目的は、（ｉ）象牙質切片中のレーザー光線の通過の後に、そして（ｉｉ）細菌がコラーゲンマトリックス中に埋め込まれている場合に、殺菌可能であるかどうかを調べることである。
方法
（ｉ）　ヒト大臼歯からの象牙質切片を、８、１６、２４および３２時間の間、０．１ＭのＥＤＴＡで脱イオンした。等容量のＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｍｕｔａｎｓの一夜培養物および０．０５％のＴＢＯを井戸型微小滴定プレート中に置いた。一つの象牙質の切片を介在させて懸濁液を２４０秒間７．３ｍＷのＨｅＮｅレーザーからの光線に露光した。露光前およびその後に細菌を数えた。１１ｍＷのＧａＡｓレーザーと組み合わせて光増感剤としてＡＤＰを用いてその実験を繰り返した。
（ｉｉ）　コラーゲンゲル中のＳ．ｍｕｔａｎｓの懸濁物を一夜乾燥させて細菌含有プラグ（ｐｌｕｇ）を形成した。ＴＢＯ（またはＡＤＰ）を加えそして６０秒間、該プラグをＨｅＮｅ（またはＧａＡｓ）レーザーに露光した。該プラグをコラーゲンでダイジェストしそして生存している細菌を数えた。
結果
（ｉ）　ＨｅＮｅレーザーと細菌懸濁液との間に象牙質切片を介在させた場合に実質的な殺菌が達成された。これらは１．８ｘ１０^{6}～３．６６ｘ１０^{7}ｃｆｕの範囲にわたっていた。殺菌の程度と象牙質切片を脱イオンした時間との間には関連性はなかった。ＡＤＰ／ＧａＡｓ組み合わせの場合に、同様なパターンの結果が得られた。殺菌された数は１．２ｘ１０^{6}～１．３４ｘ１０^{7}ｃｆｕの範囲にわたっていた。また、殺菌の程度と脱イオン化時間との間には関連性がなかった。
（ｉｉ）　細菌含有コラーゲンプラグの照射の後に、ＴＢＯ／ＨｅＮｅシステムおよびＡＤＰ／ＧａＡｓシステムについて、殺菌数は、それぞれ８．９４ｘ１０^{8}および２．０８ｘ１０^{8}ｃｆｕであった。染料またはレーザー単独で使用された場合の対照は統計的に有意な殺菌を示さなかった。
この研究の結果は、光線がヒト象牙質の２００μｍ厚さの切片を通過した場合でさえそして細菌がコラーゲンマトリックス中に埋め込まれた場合でさえ、光増感されたＳ．ｍｕｔａｎｓを低出力のレーザー光線によって殺菌することが出来ることを示した。これはう食原性微生物の致死光増感がインビボにおけるむしば損傷において見いだされる状況に一層近く似ている条件下に達成されることが出来ることを示す。
例　８
インビボ使用のモデル
血清の存在下にＣａｎｄｉｄａ　ａｌｂｉｃａｎｓの致死光増感
Ｃ．ａｌｂｉｃａｎｓにより生じた口腔損傷および病変において、その細胞は一定不変に、血清に富んだ環境にある。血清は（たとえば光増感剤と錯化することにより）致死光増感を妨げる可能性があるので、血清の存在下に殺菌を達成させることが出来るかどうか調べることは重要である。
Ｃ．ａｌｂｉｃａｎｓの一夜培養物の２ｘ５ｍｌの一定分取部分を遠心分離し、一方は５０ｍｌの滅菌ＢＨＩブロス中にそして他方は５０ｍｌの馬血清中に、一定分取部分を再懸濁させた。次ぎに、０．１ｍｇ／ｍｌのＴＢＯの存在下に該微生物の生存力上へのＨｅＮｅレーザー光線（１２０秒露光）の効果を、上記例において記載したとおりにして調べた。
血清の不存在下に、３．７４ｘ１０^{3}ｃｆｕ含有する懸濁液中の殺菌パーセンテージは６０％であり、一方血清の存在下に殺菌パーセンテージは６６％であった。これらの結果は、馬血清がＴＢＯ－増感されたＣ．ａｌｂｉｃａｎｓのＨｅＮｅレーザー光線誘導殺菌を妨げないことを示す。
例　９
ゲルデリバリ（ｄｅｌｉｖｅｒｙ）システムの使用
０．５ｇのグアルヒドロキシプロピル（ｇｕａｒ　ｈｙｄｒｏｘｙｐｒｏｐｙｌ）誘導体

（ＢＤＨ　Ｌｔｄ．）を１００ｍｌの水に溶解してゲルを形成しそしてトルイジンブルーＯを５０ｍｌのゲルに加えて１００μｇ／ｍｌの最終濃度を得た。染料含有ゲルおよび染料を含有しないゲルの一定分取部分を、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｍｕｔａｎｓの懸濁液に加えそして２４０秒間、ＨｅＮｅレーザーからの光線に露光した。照射されていない細菌含有ゲルを対照として用いた。各々のゲル中の生存微生物の数を生菌数算定により調べた。

トルイジンブルーを含有するゲル中の微生物の生菌数においてかなりの減少（３．３５ｘ１０^{7}ｃｆｕ）があり、これは、光増感剤をゲル担体中に存在させる場合に、Ｓ．ｍｕｔａｎｓの致死光増感が達成させることができることを示す。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A61P 31/02 (2006.01) A61P 31/02

(72)発明者 ウィルソン, マイクル
イギリス国 ダブリュシー1エックス 8エルデイ ロンドン, グレイズ イン ロード, イーストマン デンタル ホスピタル （番地なし）, インスチチュート オブ デンタル サージェリー 気付
(72)発明者 ハーベイ, ウィルソン
イギリス国エフケイ8 3エイエックス スターリング, ガーガンノック, ザ グレベ 23

合議体
審判長 星野 紹英
審判官 穴吹 智子
審判官 伊藤 幸司

(56)参考文献 特表平4－501717（JP, A）
国際公開第90／12573（WO, A1）
特開昭56－39004（JP, A）
特開昭63－277602（JP, A）
J. Photochem. Photobiol., (1990) 5 (3－4) p. 281－293
Photochem. Photobiol., (1977) 25 (4) p. 399－401
Photochem. Photobiol., (1979) 29 (2) p. 403－405
Br. J. Cancer, (1991) 64 (6) p. 1093－1097

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A61K31/00-31/80,41/00
C09B1/00-69/10
CA
CAOLD
WPI