

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11217

研究課題名(和文) 非熱的不可逆エレクトロポレーションによるインプラント周囲炎の低侵襲治療法

研究課題名(英文) Minimally invasive treatment of periimplantitis by nonthermal irreversible electroporation

研究代表者

江崎 大輔 (ESAKI, DAISUKE)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：10608970

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、チタン表面に培養したバイオフィルムに対する過硝酸の殺菌効果について検討を行うことを目的とした。チタンディスク上にStreptococcus gordonii(ATCC10558株)を培養し、NS、0.025%BZC、0.2%CHX、4.6mmol/L PNA、24h、25℃で4.6mmol/LのPNAを静置し殺菌活性を失活させたPNAの7種類で薬液を用いて殺菌効果の比較を行った。CFU assayの結果、PNAでは、作用時間10秒で菌数が検出限界以下であった。他の消毒薬と比較し、PNAが、細菌汚染したチタン表面の殺菌に有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to investigate the bactericidal effect of Peroxynitric acid on the biofilm cultured on titanium surface. Streptococcus gordonii (ATCC 10558) was cultured on a titanium disc with NS, 0.025% BZC, 0.2% CHX, 4.6 mmol / L PNA, and 4.6 mmol / L of PNA which was left standing at 25 ° C-24 hour to inactivate bactericidal activity. These seven type of chemical solution were compared with bactericidal effect. As a result of the CFU assay, in PNA, the number of bacteria was less than the detection limit at an action time of 10 seconds. Compared with other disinfectants, it was suggested that PNA is useful for sterilizing bacterially contaminated titanium surfaces.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：インプラント周囲炎 殺菌 過硝酸

1. 研究開始当初の背景

現在、インプラント補綴治療は、高い生存率および成功率 (Motamedian et al., 2016 de Mello JS et al., 2017) が報告されており、咬合及び審美障害を回復する手段として有用性が実証され、現代の歯科治療の一分野を確立している。

その一方で、インプラント周囲の炎症という偶発症の報告が増加している。インプラント周囲炎に対する治療法の指標として、Langら (Mombelli A et al., 2000; Lang et al., 2004) が提唱している累積的防御療法 (Cumulative Interceptive Supportive Therapy: CIST) がある。このアプローチは、まず、デンタルプラークの蓄積、プロービングデプス、エックス線写真による辺縁骨の骨頂部の変化を元に、機械的清掃及び研磨を行い、インプラント表面に付着しているバイオフィルム、石灰化物等の汚染物質を取り除き起炎物質を除去する。さらに、病状が進行している場合、殺菌洗浄、局所的及び全身的な抗菌薬投与へと、プロービングデプスや骨吸収が大きくなるにつれ段階が進み、最終的に外科処置へと移行する。このように機械的除去療法、殺菌療法、抗菌療法、外科療法の4つの柱を累積的に組み合わせた治療法が推奨されているものの、具体的な治療方法は確立していない (Charalampakis et al., 2011)。インプラント表面汚染物質の機械的除去方法に関しては、過去より数多くの報告があり、プラスチックスケラ (Speelman et al., 1992)、超音波スケラ (Sato et al., 2004)、ラバーカップ (Rapley et al., 1990; Thomson-Neal., 1989)、チタンブラシ (John G et al., 2013)、パウダーフロー (Parham et al., 1989; Schwarz et al., 2015; Gordon et al., 2015) などがあるが、インプラントは、そのスレッド構造及び、粗な表面性状のため、機械的除去療法のみではインプラント体に付着する細菌由来のバイオフィルムの完全な除去が困難であるため、機械的除去後に残存したバイオフィルムの殺菌療法に着目した。

2. 研究の目的

化学合成した PNA をチタンインプラント周囲炎治療へ応用するため、表面に形成したバイオフィルムに対する新規殺菌方法の開発を行うことを目的として、チタン表面に対するバイオフィルム形成モデルを作製し、バイオフィルムへの PNA 溶液と各種消毒薬の殺菌力の比較を行った。

3. 研究の方法

チタンディスクの準備

JIS 2 種純チタンディスク (直径 12.0mm, 厚さ 1.5mm: Sky・Blue, Fukuoka, Japan) を使用した。なおこれらのチタンディスクは、実験に使用する前に、滅菌パックに個包装後、線滅菌を行い、使用直前に開封して用いた。

ペリクルの形成

健常成人ボランティア 4 名 (男性 2 名、女性 2 名) から安静時唾液を採取し、不純物を除去するために Hirota らの方法 (Hirota et al., 2011) に則り、4、12000G で 20 分間遠心分離後、遠心上清を回収しフィルター滅菌 (Millex® HA 0.5 µm; Merck Millipore, Billerica, MA, USA) を行った。この滅菌した 4 名の唾液を等量ずつ混合したものを試験用唾液とした。実験には、チタンディスクを 12 穴プレート (Falcon®, Corning, NY, USA) の各ウェルに設置し、2ml の試験用唾液を添加して 5% CO₂ 大気圧下 37 に 30 分静置して、ペリクルの形成を行った。チタンディスクの操作は全て無菌的操作下で行った。

培養条件と供試菌株

チタンディスクに付着させる菌として *Streptococcus gordonii* (ATCC 10558 株, 以下 *S. gordonii*) を使用した。*S. gordonii* は、血液寒天培地から単一のコロニーを選択回収し、Brain Heart Infusion Broth (BHI; Difco™, Grand Island, NY, USA) 液体培地を用いて播種、攪拌し、5% CO₂ 大気圧下 37 で培養を行った。

チタンディスク上でのバイオフィルム形成

培養後の菌液から集菌した *S. gordonii* を BHI 7ml (+1% glucose 140 µl) 中に播種し、ペリクルを形成したチタンディスクに試験用唾液を除去し、BHI 菌液 50 µl を加えて 5% CO₂ 大気圧下 37 に 24 時間静置することでバイオフィルムを形成させた。バイオフィルム形成後のチタンディスクを BHI 菌液中から PBS 中に移し、新しい PBS で 2 度軽く洗い流し、新しいウェル内に静置した。

過硝酸 (PNA) 合成

PNA 溶液は、1.0 M HNO₃ 45 µL と 6.0% H₂O₂ 60 µL を添加して氷冷したものに 10% NaNO₂ を 50 µL 添加することで合成した。得られた溶液の PNA 濃度は 120mM であった。

この PNA 溶液を希釈して 4.6mmol/L, 2.3mmol/L, 0.92mmol/L 濃度の PNA 溶液を各々作成した。全ての希釈においては、蒸留水と終濃度 20mM クエン酸 buffer を使用した。PNA 溶液を希釈すると pH が変化しやすく、pH 3.2 に維持するために 20mM クエン酸 buffer を含めた PNA 溶液を作製した。なお、PNA の合成、希釈は殺菌試験の直前に行った。

過硝酸 (PNA) 不活化

初発濃度 4.6mmol/L の PNA 溶液を作成後、27 室温にて 24 時間静置することで PNA を完全に分解させたものを不活化 PNA 溶液とした。この不活化 PNA 溶液は、CFU Assay にて完全に失活したことを確認している。

バイオフィルムの殺菌試験

生理食塩水 (NS; Normal Saline, Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd, Tokyo, Japan)、0.025% 塩化ベンザルコニウム (BZC; Benzalkonium Chloride Disinfectant Solution, Yoshida Pharmaceutical Co., Ltd, Tokyo, Japan)、0.2% クロロヘキシジングルコン酸溶液 (CHX; Chlorhexidine digluconate solution, SIGMA-ALDRICH, Pharmaceutical Co., Ltd, Tokyo, Japan)、4.6mmol/L、2.3mmol/L、0.92mmol/L の PNA 溶液、失活 PNA 溶液、7 種類の薬液比較を行った。各群 9 枚のバイオフィルム形成後のチタンディスクを静置したウェルに、各薬液 2ml を加え、0、10、20、30 秒と薬液処理後、殺菌反応を停止させるため、Soybean-Casein Digest Broth with Lecithin & Polysorbate 80; (SCDLP; broth, Nihon Pharmaceutical Co., Ltd, Tokyo, Japan) を薬液と同量の 2ml 加えた。その後、PBS にて洗浄した。どの過程においても、バイオフィルムが剥離しないように、静的に操作を行った。

殺菌試験では、各群 9 枚の各薬液処理後のチタンディスクを 900 μ l の BHI が入った 1.5ml 用のマイクロチューブに入れ、チューブミキサーで攪拌しチタンディスクからバイオフィルムを剥離させた。その懸濁液を段階希釈後、BHI 寒天培地にて 3 日間、5% CO₂ 大気圧下 37 で培養し colony forming unit (CFU) にて生菌数の評価を行った。

SEM (Scanning Electron Microscope) によるチタン表面の *S. gordonii* の附着状態の観察

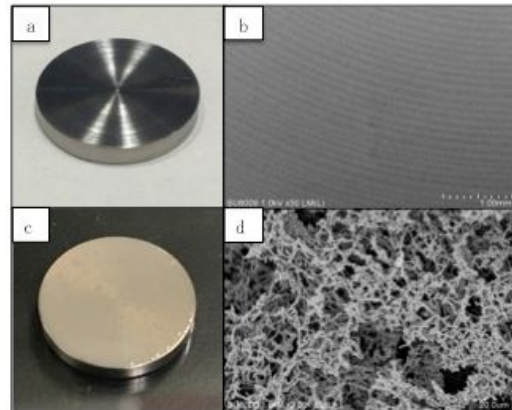
各群 9 枚のバイオフィルム形成後のチタンディスクを NS、0.025%BZC、0.2%CHX、4.6、2.3 および 0.92mmol/L の PNA 溶液で 30 秒間薬液処理した後、固定液 (2.5% グルタルアルデヒド、4% ホルマリン) 2ml 中に浸漬し、4 冷蔵庫内に 30 分間静置することでバイオフィルムの固定を行った。その後、50% エタノール、70% エタノール、100% エタノール、100% エタノール/t-ブチルアルコール等量混合液、t-ブチルアルコール中に浸漬して 5 分間静置した。その後、t-ブチルアルコールを 2 回置換し、4 で凍結後、凍結乾燥機 (JFD-300; JEOL, Tokyo, Japan) にて t-ブチルアルコールを昇華させ、電子顕微鏡試料作製装置 (MSP-1S; VACUUM DEVICE, Ibaraki, Japan) を用い、電導処理を行った。超高分解能電界放出型走査電子顕微鏡 (Field Emission Scanning Electron Microscope: FE-SEM (SU8000; Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japan)) により、加速電圧 1.0kV の条件でチタンディスク表面の *S. gordonii* の附着状態を観察した。

4. 研究成果

SEM による Ti 表面への培養前、24 時間培養

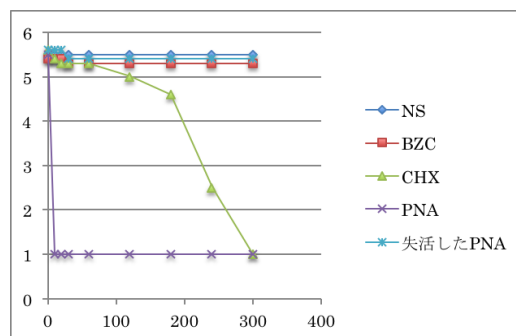
後のバイオフィルム附着状態の観察結果

チタンディスク表面に対する細菌培養前、24 時間培養後の附着状態を図に示す。培養前ディスクでは、同円心状の形態がみられる。培養後は、チタン上に乳白色のバイオフィルムが附着しており、SEM 像では、微細な Corn-cob 状の連鎖球菌が確認できる。今回用いた培養方法で、24 時間培養後にバイオフィルムが十分に附着していることが確認された。



S. gordonii バイオフィルムに対する各 PNA 濃度と比較した各種薬液の殺菌力の評価

MS 群と RS 群のチタン表面への各種薬液の殺菌時間と生菌数の変化を示す (Fig10,11)。PNA 群は、10 秒から検出限界以下、その他の薬剤に関しては、30 秒経過した時間でも変化はほぼ認められなかった。CHX では、120 秒から生菌数の低下が見られ、300 秒経過した時点で、検出限界以下であった。



本研究では、チタン表面に *S. gordonii* を培養することで、バイオフィルムモデルを作製した。過硝酸 (PNA) がバイオフィルム附着モデルに対して、高い殺菌効果を示すことを明らかにした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江崎 大輔 (ESAKI DAISUKE)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：10608970

(2) 研究分担者

松下 恭之 (MATSUHITA YASUYUKI)

九州大学・病院・准教授

研究者番号：60159150

古谷野 潔 (ESAKI DAISUKE)

九州大学・歯学研究院・教授

研究者番号：50195872

大木 郷資 (OKI KYOSUKE)

九州大学・大学病院・医員

研究者番号：10803463