

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17135

研究課題名(和文)水酸化ラジカルを応用したインプラント周囲炎治療の確立 銀イオンへの紫外線照射効果

研究課題名(英文) development of novel peri-implantitis treatment using hydroxyl radical- effect of combination with ultraviolet irradiation and silver ions

研究代表者

石山 希里香 (Ishiyama, Kirika)

東北大学・歯学研究科・助教

研究者番号：20712904

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では銀イオンとUVA照射を併用した水酸化ラジカルを応用するインプラント周囲炎治療の確立を目的とした。その結果、銀イオン単独よりも、UVA照射を併用した方が殺菌効果が高く、銀イオン濃度依存的に殺菌効果が上昇することを確認した。これにより発生する水酸化ラジカル量がUVA照射を併用すると有意に発生量が大きくなることが分かった。また、処理後のチタン表面の細胞親和性は高く、骨付着することも確認できた。このことから本治療方法は、インプラント周囲炎に対して有効な治療方法になることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯科インプラント周囲炎の罹患率は世界的にも増加している一方で、いまだ有効な治療方法は確立していないため、その治療方法の確立が課題となっている。汚染したチタン表面の殺菌効果だけでなく、細胞侵襲性が低いこと、その後の細胞親和性が向上したことから、水酸化ラジカルを応用した殺菌療法はインプラント周囲炎に有効な治療方法となることを示唆した。インプラント治療は口腔内でだけでなく、膝や股関節などの整形領域でも広く行われている治療であり、生体侵襲性の低い水酸化ラジカルを応用した本治療方法の応用範囲は広いと思われる。

研究成果の概要(英文)：This study investigated the bactericidal effect, the underlying mechanisms of treatment, and recovery of biocompatibility of the infected titanium surface using a combination treatment of silver ion application and ultraviolet-A (UV-A) light irradiation. The bactericidal effect of the combination treatment was significantly higher than that of silver ion application or UV-A light irradiation alone. The bactericidal effect of the combination treatment was attributable to hydroxyl radicals. Furthermore, the titanium surface that underwent the combination treatment exhibited recovery of biocompatibility by allowing cellular proliferation or calcification at levels observed in the non-infected titanium surfaces and the removal torque was also comparable to the control values. From these results, this approach is a novel treatment option for peri-implantitis.

研究分野：歯科補綴

キーワード：インプラント周囲炎 殺菌 水酸化ラジカル 銀イオン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

チタン製の歯科用インプラントは、表面のナノ・マイクロ構造化などによって安定した骨結合の早期獲得が可能となったことで、世界的に広く普及し、一般的な歯科治療となりつつある。しかし、普及に伴い、細菌感染によって発症するインプラント周囲炎も数多く報告されてようになってきた。歯周病原菌の全身への影響が取り立たされている中、インプラント周囲炎への有効な治療方法はないことが喫緊の課題となっている。インプラント周囲炎の治療では、チタン表面に付着した細菌を除去し、かつ変性した表面性状を骨の再付着が得られるまでに回復させることが求められる。現在のインプラント周囲炎治療では、機械的なバイオフィーム除去に併せてクロロヘキシジン (CHX) などの消毒薬を用いた殺菌法などが臨床応用されている。しかしながら、CHX などの有機系薬剤はチタン表面に吸着して骨芽細胞の増殖を阻害するため、有機系薬剤を用いない抗菌療法の応用が望ましい。

チタン製インプラントの表面に形成される酸化チタン膜に対して UV 照射を行うと、光触媒作用により水酸化ラジカルが生成されることが知られている。水酸化ラジカルは、酸化力が強い活性酸素として知られ、生活習慣病、老化の引き金となる可能性があることが報告されている。しかし、それは長期にわたって発生する場合であり、申請者の研究室では、これまでに水酸化ラジカルによる殺菌効果を検証し、局所的短期的な発生をさせることで、殺菌治療に応用できること、特に歯周炎治療に有効であることを報告してきた。水酸化ラジカルは反応性が高く、インプラント表面の汚染物質を分解・除去し、表面の細胞親和性を回復する効果も期待できる。しかし、過度な UVA 照射量は生体への毒性を増加させる可能性があるため、少ない UVA 照射量でより効果的な殺菌効果を示す技術の開発が求められていた。一方、銀イオンは古くから殺菌効果があることが知られており、インプラント表面への細菌感染リスクを減少させることが報告されている。そこで、申請者は銀イオンと UVA 照射を併用することでよりインプラント表面に対しより効果的な殺菌効果を示せるのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究は、銀イオンおよび酸化チタンに対する UVA 照射で生成する水酸化ラジカルを応用した新しい概念のインプラント周囲炎治療法の確立とそのメカニズムを解析することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 銀イオンと UVA 照射による殺菌効果の検証

細菌は、口腔内のカリエスや歯周病の原因菌とされている *Streptococcus mutans* JCM5705 (RIKEN BioResource Center, Wako, Japan) と *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* JCM2434 (RIKEN BioResource Center, Wako, Japan) を使用した。細菌をそれぞれ含んだ懸濁液 100 $\mu$ L (最終濃度: 10<sup>7</sup> CFU/mL) に対し、硝酸銀溶液 100 $\mu$ L (最終濃度: 50 もしくは 100, 200, 400, 600, 800, 1000  $\mu$ M) を加え、UVA (365nm, 1000 mW/cm<sup>2</sup>) を 1 分間照射した。コントロール群として 1 分間暗室に置いたものを設定した。その後、反応液を回収し、寒天培地に播種、48 時間後の細菌コロニー数を計測した<sup>1)</sup>。

また、*S. mutans* もしくは *A. actinomycetemcomitans* が形成した biofilm を作成し、同様に UVA (365nm, 1000 mW/cm<sup>2</sup>) を 1 分間照射した。その後、PBS で洗浄したのち、I 型コラゲナーゼ (4 mg/mL; Thermo Fisher Scientific, Japan) 及びディスパーゼ (2 mg/mL; Thermo Fisher Scientific, Japan) を加え、残存した細菌を回収し、48 時間後の細菌コロニー数を計測した。

各群は次のように表記した。Ag(+)-L(+): 銀イオン + UVA 照射群、Ag(+)-L(-): 銀イオン + UVA 非照射群、Ag(-)-L(+): PBS + UVA 照射群、Ag(-)-L(-): PBS + 非 UVA 照射群

#### (2) 銀イオンと UVA 照射による水酸化ラジカル発生量の計測

5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO) (Labotec, Tokyo, Japan) に *S. mutans* もしくは *A. actinomycetemcomitans* を含有した懸濁液 (10<sup>8</sup> CFU/mL) 及び、硝酸銀溶液 (0, 100, 200, 400, 800, 1200, 1600, 2000  $\mu$ M) を加えた溶液に UVA (365nm, 1000 mW/cm<sup>2</sup>) を 1 分間照射した。コントロール群として 1 分間暗室に置いたものを設定した。その後、直ちにすぐに X-band ESR spectrometer (JES-FA-100, JEOL, Tokyo, Japan) を用いて DMPO-OH のラジカルの波形を計測した。また捕捉した DMPO-OH は the Digital Data Processing software (JEOL) を用いてその濃度を計算した。

*S. mutans* もしくは *A. actinomycetemcomitans* が形成した Biofilm についても、DMPO 及び硝酸銀溶液を加えたのち UVA (365nm, 1000 mW/cm<sup>2</sup>) を 1 分間照射し、同様にラジカルの波形を計測しその濃度を計算した。

#### (3) 銀イオンと UVA 照射による殺菌効果のメカニズムの解析

はじめに *S. mutans* もしくは *A. actinomycetemcomitans* の細胞分画を Kumode らの方法<sup>3)</sup>に従い作成した。即ち、*S. mutans* もしくは *A. actinomycetemcomitans* を BHI broth or BHI-YE 溶液中に 37 環境下で 24 時間培養したのち、13,000  $\times$  g で 10 分間、4 の環境下で遠心分離にかけたの

ち、protoplast buffer 及び lysozyme を加えて 37°C で 16h 培養した。その後、再び遠心分離にかけ細胞壁を回収した。超純水で再び懸濁後、再度遠心分離にかけ上澄み中の細胞膜と沈殿物(細胞質)を回収した。

続いて、回収したそれぞれの細胞分画 75  $\mu$ L に 75  $\mu$ L の硝酸銀溶液 2 mM 及び 50  $\mu$ L の DMPO (75 mM) を加え、その後 UVA (365nm、1000 mW/cm<sup>2</sup>) を 1 分照射し、捕捉した DMPO-OH 量を計測した。

#### (4) 銀イオンと UVA 照射がチタン表面の biofilm に及ぼす影響の検証

Nakamura らの方法<sup>2)</sup>に従い、チタンディスク(直径: 5 mm; thickness)にサンドブラストをかけたのち硫酸でエッチングを行った後、オートクレーブにかけて滅菌処理を行うことで、歯科用インプラントと同様な表面性状を持つチタンディスクを作成した。その後、チタン表面に *S. mutans* もしくは *A. actinomycetemcomitans* を播種し、24 時間インキュベートすることでチタンディスク表面上に biofilm を作成した。ついで、硝酸銀溶液(1 mM)もしくは PBS に浸したのち、UVA(365nm、1000 mW/cm<sup>2</sup>) 照射もしくは暗室での放置を 1 分間行った。処置後のチタン表面の表面性状を形態的に観察するため、グルタルアルデヒドで固定後、SEM 観察を行った。

また、銀-UVA 照射併用療法後のチタン表面への細胞付着率を調べるため、*A. actinomycetemcomitans* 由来の biofilm をチタン表面に作成後、同様に硝酸銀溶液(2 mM)もしくは PBS に浸漬後、UVA(365nm、1000 mW/cm<sup>2</sup>) 照射もしくは暗室での放置を 1 分間行った。その後、MC3T3E1 細胞( $3 \times 10^4$ /well, RIKEN Cell Bank, Tsukuba, Japan)を播種し、37°C、5%の二酸化炭素濃度下でインキュベートした。3 日後、チタンディスクを取り出し、3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT; Sigma, Japan) を用いて MTT 試験を行い、細胞付着率を評価した。また、インキュベート 28 日後に Alizarin red S を用いて石灰化物を染色後、ギ酸に溶解することで色素を抽出し、415nm にて吸光高度計(Spectra MAX 190; Molecular Devices, Japan)を用いて細胞の石灰化能を評価した。

#### (5) 銀イオンと UVA 照射が及ぼす細胞毒性への検証

はじめに MC3T3E1 細胞 ( $5 \times 10^3$ /well) を 96 well plate に播種し、37°C、5%の二酸化炭素濃度下で 1 日インキュベートした。その後、上澄み液を取り除いたのち、100  $\mu$ L の硝酸銀溶液(100, 200, 400, 800, 1200, 1600, and 2000  $\mu$ M)を加え、UVA(365nm、1000 mW/cm<sup>2</sup>) 照射もしくは暗室での放置を 1 分間行った。その後、新しい Medium に交換した。3 時間後に MTT 試験を行い、銀 UVA 照射併用療法が細胞の生存に及ぼす影響を評価した。

#### (6) 汚染チタン表面に対する銀イオンと UVA 照射療法後の生体親和性の検証

純チタンねじ(直径 1.6 mm、長さ 6.12 mm: Fukuoka Seimitu, Japan)にサンドブラスト及びエッチング処理を行った後、オートクレーブにかけて滅菌処理を行った、その後、上述の方法を用いて *A. actinomycetemcomitans* 由来の biofilm を形成したのち、硝酸銀溶液(2 mM)に浸したのち、直ちに UVA(365nm、1000 mW/cm<sup>2</sup>) 照射を 1 分間行った。コントロール群は、サンドブラスト、エッチング処理及びオートクレーブ処理を行った純チタンねじとした。全身麻酔下及び局所麻酔下にて、Wistar ラット(オス: 8 週齢)の大腿骨に移植し、28 日後にトルク除去試験及び、ヘマトキシリン-エオジン染色を行い組織観察を行った。

すべての実験において、統計は Shapiro-Wilk test を行い、正規分布の検定を行った後、2 群間の比較は Student's t-test を、多群間比較は、Tukey-Kramer honestly significant difference test を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 銀イオンと UVA 照射による殺菌効果の検証

図 1 に各処理後の殺菌効果を示す。*S. mutans* もしくは *A. actinomycetemcomitans* 懸濁液では、銀単独(Ag(+))L(-))及び銀 UVA 照射併用処置(Ag(+))L(+))の両群において銀の濃度依存的に殺菌効果が認められた。特に銀 UVA 照射併用処置群では、銀単独よりも低い濃度で殺菌効果を示すことが明らかとなった。また、biofilm に対しても、銀 UVA 照射併用処置は、銀単独よりも殺菌効果が高いことが明らかとなった。

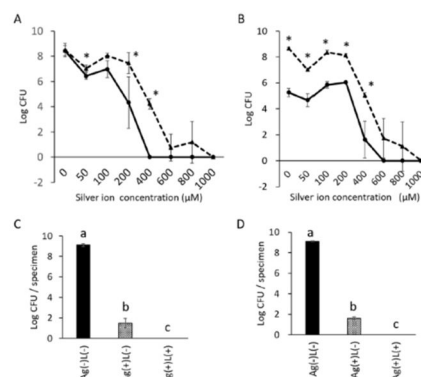


図1: 銀-UVA照射併用療法の殺菌作用  
A: *S. mutans* 懸濁液に対する殺菌効果、B: *A. actinomycetemcomitans* 懸濁液に対する殺菌効果、C: *S. mutans* biofilmに対する殺菌効果、D: *A. actinomycetemcomitans* biofilmに対する殺菌効果

### (2) 銀イオンと UVA 照射による水酸化ラジカル発生量の計測

図2に各細菌の懸濁液もしくはbiofilmに対する硝酸銀(2 mM)とUVA照射後にDMPOで捕捉したDMPO-OHの波形を示している。波形の形から、発生したラジカルは水酸化ラジカルであることが明らかとなった。次いで、図3に各処理後に発生した水酸化ラジカルの濃度を示す。細菌懸濁液及びbiofilmに対して加える硝酸銀の濃度依存的に発生する水酸化ラジカルの濃度が増加することが明らかとなった。一方、細菌がない場合、もしくは硝酸銀がない場合、UVA照射をしない場合では、水酸化ラジカルが発生しなかった。このことから、水酸化ラジカルが発生するためには、細菌と硝酸銀がある状態で、UVA照射する必要があることが示唆された。

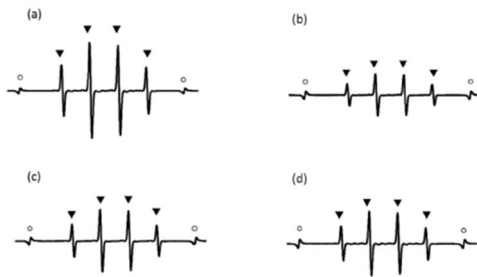


図2：ラジカル波形  
a: *S. mutans* 懸濁液、b: *A. actinomycetemcomitans* 懸濁液、  
c: *S. mutans* biofilm、d: *A. actinomycetemcomitans* biofilm

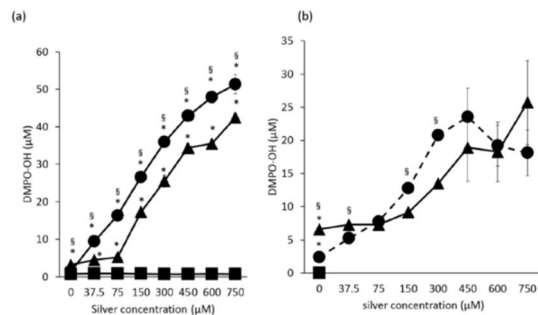


図3：DMPO-OH発生量  
a:細菌懸濁液、b:biofilm  
● *S. mutans*、▲ *A. actinomycetemcomitans*、× 超純粋、■ 細菌なし

### (3) 銀イオンとUVA照射による殺菌効果のメカニズムの解析

次いで、UVA照射する際に、細菌のどこに銀イオンが付着した場合に水酸化ラジカルが発生するのかを調べた。表1に、各細胞分画別の水酸化ラジカル発生量を示す。硝酸銀と細胞壁の組み合わせの時にUVAを照射すると高い濃度のDMPO-OHが捕捉された。このことから、銀イオンが細菌の細胞壁に付着した場合に水酸化ラジカルが発生することが示唆された。

表1. 細胞分画別水酸化ラジカル発生量

DMPO-OH (μM)	Cell wall	Cell membrane	Cytoplasm	
<i>S. mutans</i>	2.3 ± 1.0	0.3 ± 0.4	0.2 ± 0.1	
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	5.3 ± 0.7	0.1 ± 0.0	0.4 ± 0.3	
LPS (1 μg / mL)				87.7 ± 5.1
Peptidoglycan (1 μg / mL)				2.0 ± 0.7

### (4) 銀イオンとUVA照射がチタン表面のbiofilmに及ぼす影響の検証

図4に各処理後のチタン表面のSEM像を示す。チタン表面にbiofilmが形成されていることが確認できた。一方、銀処理もしくは銀-UVA照射併用処理を行った場合、チタン表面からbiofilmが除去されていることが確認できた。

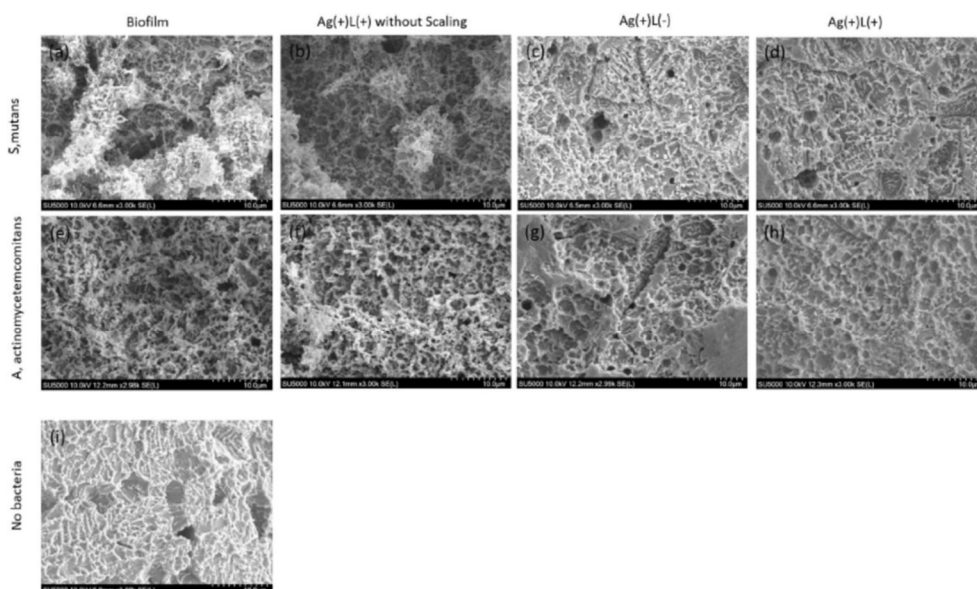


図4：各処理後のチタン表面のSEM像

図5に各処理後のチタン表面への細胞親和性を示す。細菌感染したチタン上での細胞増殖性が低いことに対し、銀-UVA照射併用処置をすることで、非感染チタン表面と同程度まで細胞増



殖性が回復することが確認できた。しかし、細胞の石灰化能については、特に有意差は認められなかったことから、銀—UVA 照射併用処置は、その後に着した細胞の石灰化能には影響を及ぼさないことが分かった。

#### (5) 銀イオンと UVA 照射が及ぼす細胞毒性への検証

図 6 に、MC3T3E1 細胞に対する銀—UVA 照射併用処置の細胞毒性試験結果を示す。銀単独及び銀—UVA 照射併用処置ともに、銀の濃度依存的に細胞毒性が増加した両群間での有意差は 50 $\mu$ M を除いて認められなかった。このことから、銀—UVA 照射併用処置は、銀イオン単独適用よりも細胞毒性が増す処置ではないことが明らかとなった。

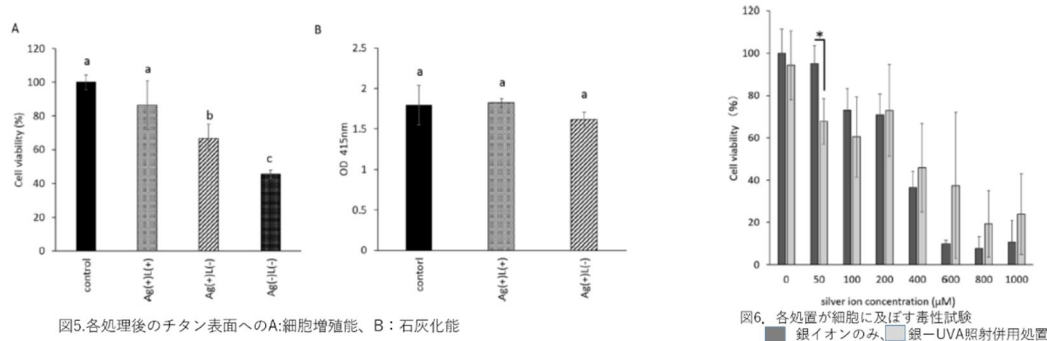


図5.各処理後のチタン表面へのA:細胞増殖能、B:石灰化能

図6. 各処置が細胞に及ぼす毒性試験  
■ 銀イオンのみ、■ 銀—UVA照射併用処置

#### (6) 汚染チタン表面に対する銀イオンと UVA 照射療法後の生体親和性の検証

トルク除去試験では、非感染性チタンねじの除去トルク力が 10.3 $\pm$ 1.5 であったのに対し、感染したチタンねじに対して銀—UVA 照射併用処置後に移植した群では 10.1 $\pm$ 1.0 であり、両群間に有意な差は認められなかった。図 7 にその組織反応を示す。非感染性のチタンねじを移植した場合、ねじ表面に直接骨組織が付着し、オステオインテグレーションが得られていることが確認できた。一方、感染したチタンねじに対して銀—UVA 照射併用処置をした場合にも同様にチタン表面に直接骨が付着していることが認められた。これらの結果から、銀—UVA 照射併用処置は、感染したチタン表面の生体親和性を回復させることを明らかにした。

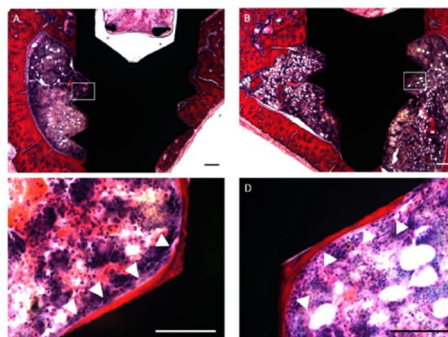


図7. 銀—UVA照射併用処置後のチタンねじをラット大腿骨に移植した28日後の組織像(ヘマトキシリン—エオジン染色)。非感染のチタンねじを移植した場合の組織反応 (A:弱拡大、C:強拡大)及び、感染したチタンねじに銀—UVA照射併用処置を行った後移植した場合の組織反応 (B:弱拡大、D:強拡大)

本報告書で使用した図は、本研究の成果を発表した scientific reports. 2020 May 22;10(1):8553.(doi: 10.1038/s41598-020-65411-4) より引用した。

#### (まとめ)

本研究では、銀イオン単独でも殺菌作用を示すが、銀イオンが細菌の細胞壁に付着した状態で UVA (365nm、1000 mW/cm<sup>2</sup>) 照射した場合に、水酸化ラジカルが発生し、より効率的な殺菌作用を示すことが明らかとなった。また、細胞毒性については銀イオン単独群と比較してほとんど有意差がなかった。さらに銀—UVA 照射併用処置したチタンねじは非感染のチタンねじと同程度の骨付着強度を示していたことから、本処置によって、感染したチタン表面の生体親和性を回復することが明らかとなった。このことから、インプラント周囲炎治療に応用できる可能性が高いことが示唆された。しかし、UVA の波長強度と水酸化ラジカルの発生量の関係性についてはまだ検証していないため、今後の検討課題としたい。

#### <引用文献>

1. Nakamura, K. et al. Bactericidal Activity and Mechanism of Photoirradiated Polyphenols against Gram-Positive and -Negative Bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 63, 7707–7713, <https://doi.org/10.1021/jf5058588> (2015).
2. Nakamura, K. et al. Hydroxyl radicals generated by hydrogen peroxide photolysis recondition biofilm-contaminated titanium surfaces for subsequent osteoblastic cell proliferation. *Sci. Rep.* 9, 4688, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41126-z> (2019).
3. Kumode, A. Effects of Various sugars on the Protoplast Formation of *Lactobacillus*. *J. Okayama Med. Assoc.* 96, 757–765 (1984).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tenkumo T, Ishiyama K, Prymak O, Nakamura K, Shirato M, Ogawa T, Miyashita M, Takahashi M, Epple M, Kanno T, Sasaki K.	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 Bactericidal activity and recovery effect of hydroxyl radicals generated by ultraviolet irradiation and silver ion application on an infected titanium surface	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 scientific reports	6. 最初と最後の頁 8553
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-65411-4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Taichi Tenkumo, Toru Ogawa, Kirika Ishiyama, Keisuke Nakamura, Midori Shirato, Makiko Miyashita, Taro Kanno, Keiichi Sasaki
2. 発表標題 Bactericidal effect of combination treatment with silver-ion application and ultraviolet-irradiation
3. 学会等名 IADR-APR（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
ドイツ	University of Duisburg-Essen		