

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2022

課題番号：20K23013

研究課題名（和文）カーボンナノホーンをDDSキャリアとするインプラント周囲炎への革新的治療法の開発

研究課題名（英文）Novel treatment for peri-implantitis using carbon nanohorns as a DDS carrier

研究代表者

前田 由佳利（Maeda, Yukari）

北海道大学・大学病院・医員

研究者番号：40884622

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：生体吸収性ハイドロゼラチンゲルを用いて、ゲル化したMC/CNHsはラット皮下埋入にて炎症性を示さなかった。ラット第一大臼歯抜歯後にTiスクリューを即時埋入し、4週経過後にリガチャーワイヤーを歯肉溝に巻いて歯周炎モデルラットを作製した。CNHsとの複合体においてクロルヘキシジン（CHX）・塩化ベンザルコニウム（BAC）・レボフロキサシン・FGFの作製に成功した。NIH-3T3を用いた細胞培養ではFGF/CNHsは細胞毒性を有せずFGFの効果を保持していたが、*S. mutans*菌を用いた菌培養ではCNHsに担持させることでそれぞれが持つ消毒作用を減弱させる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ラット皮下に化学架橋剤不使用の生体吸収性ハイドロゼラチンゲルに包埋したMC/CNHsを注入し、炎症を惹起しなかったことから、*in vivo*での安全性が確立された。CNHsと薬剤を複合体とすることでCNHsの分散性を向上させ、さらに静菌作用等の付帯効果を与えることが可能となった。この特徴を用いてインプラント周囲炎への局所薬物送達療法への応用が期待できると考えている。

研究成果の概要（英文）：Gelatinized MC/CNHs did not show inflammatory properties when implanted subcutaneously in rats using bioabsorbable hydro gelatin gel. A rat model of periodontitis was created by immediate placement of titanium screws after extraction of rat first molars, and ligature wires were wrapped around the gingival sulcus after 4 weeks. Chlorhexidine (CHX), benzalkonium chloride (BAC), levofloxacin, and FGF were successfully prepared in complex with CNHs. However, the results of the cell culture using *S. mutans* bacteria suggested that CHX and BAC may reduce the disinfection effect of CNHs by loading them on CNHs.

研究分野：補綴歯科学

キーワード：カーボンナノホーン ミノサイクリン インプラント周囲炎 局所薬物送達療法 動物実験

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

カーボンナノマテリアル(CNMs)は比表面積が大きく、他物質の担持が可能な材料であることから、DDS やバイオセンサーなどバイオ領域への応用についても注目され研究が進められている。申請者らはこれまでに CNMs の生物学的特性を明らかにするとともに、生体材料への応用に取り組んできた。特に、CNHs は金属触媒を使用せず生体適合性が高いことから、生体材料への応用が期待されており、これまでに、CNHs を固着させた膜上で骨形成が促進されること(T. Kasai et al. Nanotechnology (2011))、CNHs を貪食したマクロファージが骨芽細胞の分化を促進すること(E. Hirata et al. Nanoscale (2016))を報告した。しかし、CNHs は疎水性が強いことから、生体材料へ応用するためには分散処理が必要である。申請者は、MC 水溶液と CNHs を複合(MC/CNHs)することによって、MC が CNHs の分散性を向上させること、MC/CNHs は骨芽細胞の分化や増殖に影響を及ぼさず、MC の抗菌性を保持することを明らかにした。

補綴歯科学においてインプラント治療は、予知性ならびに効果の高い治療であるが、近年、インプラント周囲炎が、臨床における問題となっている。インプラント周囲炎に対する治療としては、物理的なインプラント表面の滑沢化とプラークの除去(機械的方法)、薬剤やレーザーによる殺菌・消毒(化学的方法)が併用されることが多いが、抗菌薬を感染部位へ作用させるためには一定時間の留置が必要になる。さらに、現在汎用されているインプラント表面はマイクロ-ナノ構造を有していることから、物理的な方法には限界があり、より効果的な薬剤の投与方法の開発が期待されている。以上の問題を解決するため、CNHs が徐放能を有する(K. Ajima, et al. Molecular Pharmaceutics. 2005)ことに着目し、CNHs に MC を担持させ、インプラント周囲溝に注入することにより、感染局所で一定時間薬効を発揮しうるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

CNHs を担体とすることで感染局所への MC の留置を促す。それによって、より治療効率の良いインプラント周囲炎治療への応用を目的とする。

(1) MC/CNHs の in vivo での安全性と効果の検証。

ラット皮下に化学架橋剤不使用の生体吸収性ハイドロゼラチンゲルに包埋した MC/CNHs を注入し、in vivo での安全性を組織学的に検証する。安全性が確立された後、歯周炎モデルラットを使用し、インプラント埋入後にゲル化した MC/CNHs をインプラント周囲溝へ注入、軟組織への効果を組織学的に明らかにする。

(2) CNHs へ新たに担持可能な薬剤の探索

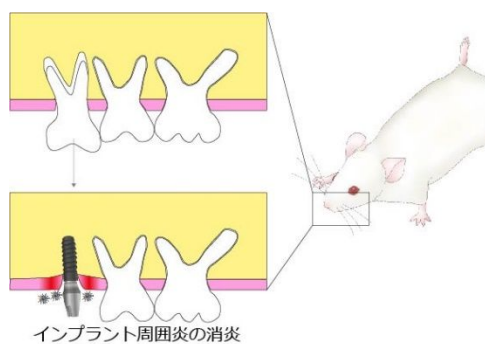
本研究の最終的な目的であるインプラント周囲炎への応用のためにも、骨増生効果を持った薬剤を CNHs に担持することができれば、炎症により喪失したオッセオインテグレーションの再獲得が可能になる。そのため FGF や BMP-2 等の成長因子の水溶液中に、CNHs を混合することで新たな複合体を作製し、その化学的・形態的物性を明らかにすると共に、細胞培養特性および in vivo での効果を検証する。

3. 研究の方法

(1) in vivo での安全性の検証

ラット皮下にコラーゲンゲルに包埋した MC/CNHs を注入し,7 日後にイソフルランと 2.5%GA を併用した還流固定によりラットを安楽死させ,背部組織を摘出した。

またラット上顎第一大臼歯を抜歯後,即時にインプラントを埋入し,4 週経過させオッセオインテグレーションを確立した。さらにインプラント体の周囲歯肉溝にリガチャーワイヤーを巻き付け歯周炎モデルラットを作製した。



(2) CNHs へ新たに担持可能な薬剤の探索

薬剤-CNHS 複合体の製作,分散性の確認

Chlorhexidine (CHX), Benzalkonium Chloride (BAC), レボフロキサシン (LVFX), FGF-basic を 1mg/mL となるように DW に溶解し水溶液を作製した。さらに粉末状の CNHs (未酸化: as-CNHS) 0.1mg に対して 0.1mg/mL となるように水溶液を添加し,冷却下において 30-60 分超音波分散させ複合体を作製した。それらは Nanodrop One^c UV-vis spectrophotometer を用いて吸光度を測定し CNHs の薬剤担持を確認した。

細胞培養

マウス線維芽細胞 (NIH-3T3) を用いて FGF/CNH の細胞毒性を検証するため, FGF, CNH 及び FGF/CNH を播種し,培養 24 時間後に WST-1 を用いて生細胞量を測定した。

細菌培養

CHX・BAC との複合体を *Streptococcus mutans* (*S.m.*): JH1000 ATCC55677 との懸濁液による吸光度測定により,口腔内細菌における抗菌活性を検証した。培地へ添加した CHX 及び BAC の濃度が 0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように各サンプルを添加し,培養直後と 20, 44 時間後での吸光度(OD600nm)より増殖度を測定した。

4. 研究成果

(1) MC/CNHs の *in vivo* での評価と歯周炎モデルラットの作製

ラット背部皮下埋入の後7日後に摘出した周囲軟組織を比較すると、どの条件においても炎症性細胞の遊走は見られなかった。また CNHs が細胞質内に取り込まれている様子が観察された。(図1a及びc)

ラット第一大臼歯抜歯後、即時埋入を行ったインプラント体の歯肉溝に、リガチャーワイヤーを結紮して7日後では、歯肉溝に食渣の停滞が認められ、組織像で炎症系細胞の浸潤と歯肉溝上皮の肥厚化が確認された。(図2)

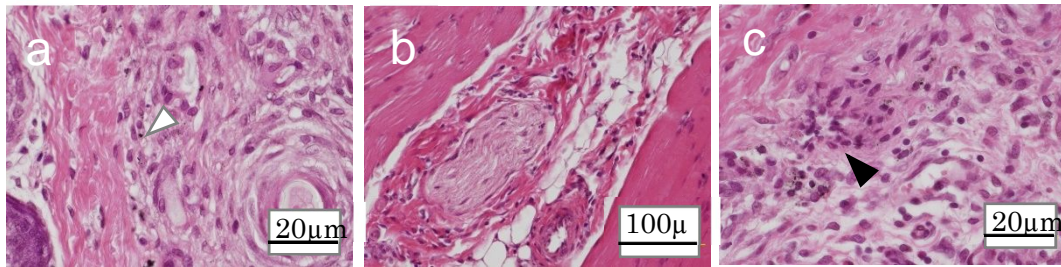


図1. 背部皮下埋入の周囲軟組織 H-E 像 (a: CNHs ,b: MC ,c: MC/CNHs ,白矢頭:CNHs ,黒矢頭:MC/CNHs)

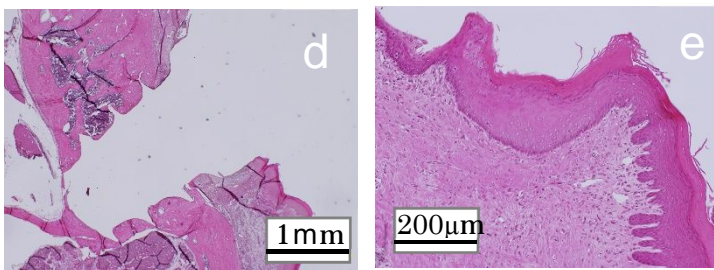


図2. インプラント埋入後の周囲歯肉組織 H-E 像 (d: インプラント体埋入5週後 , e:インプラント体埋入後4週+リガチャーワイヤー結紮後1週後)

(2) CNHs へ新たに担持可能な薬剤の探索 分散性

MC は 350nm 付近に吸光度ピークをもち、LVFX は 300nm 付近にピークをもつ。各種薬剤と CNHs 複合体の作製直後の吸光度測定結果により、分散性の向上が認められた。CNHs 単独では静置後 1 時間で沈殿化がみられたのに対して、MC と LVFX では静置後 3 時間で沈殿がみられ、CHX と BAC では静置後 4 8 時間経過後でも CNHs の分散性の向上が継続していた。これは CHX と BAC に含有される界面活性剤とエタノールによる効果と考えられる。

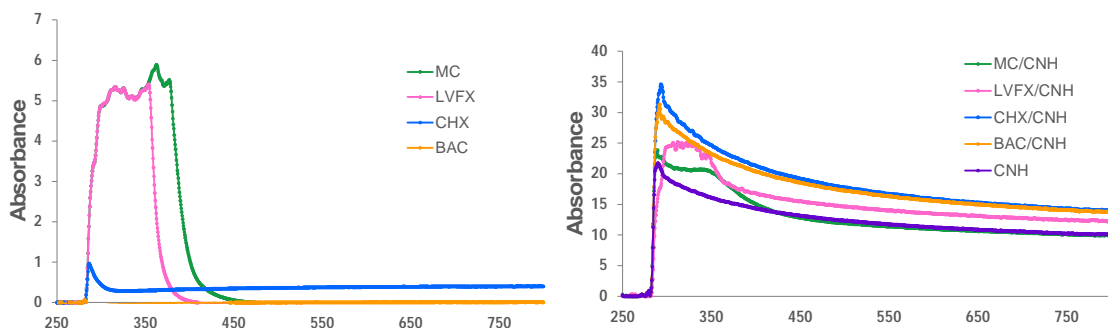


図3. 吸光度測定による各種薬剤の比較 左:薬剤のみ 右:作製直後の各種薬剤と CNHs との複合体

細胞培養

CNHs 分散時の超音波洗浄により FGF の効果を阻害しないことを確認するため、FGF のみで同時間冷水下で超音波洗浄を行ったものも比較した。CNHs の存在により NIH-3T3 の生育を阻害しないことが明らかになった。FGF との複合体 (FGF/CNHs) では、CNHs が FGF の効果を阻害しないことを明らかにした。

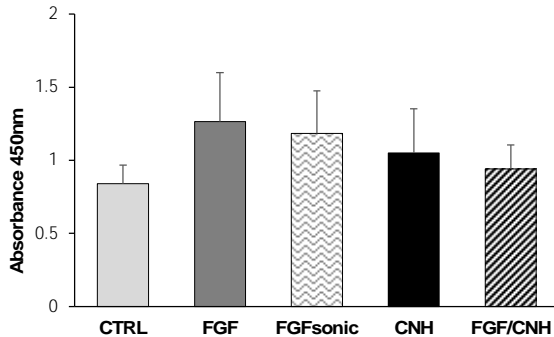


図 4 . NIH-3T3 培養 24 時間後の生細胞量

細菌培養

S.mutans に対する CHX・BAC の細菌増殖抑制効果を比較したところ、培養 20 時間後では CNHs との複合体は薬剤単体と同等の結果を示していたのに対し、培養 44 時間後では CHX の効果の減弱がみられた。BAC は CNHs の有無に関わらず、同等の細菌増殖抑制効果及び効果の継続が示唆された。

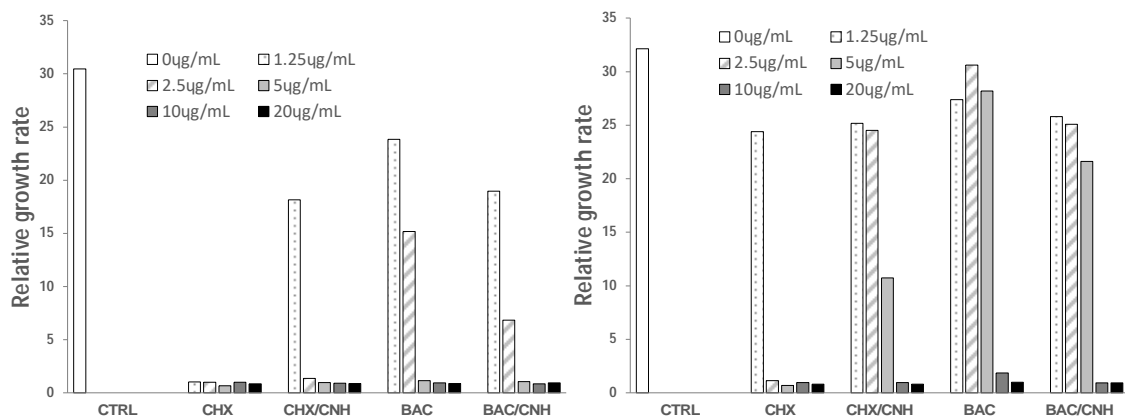


図 5 . 左:培養 20 時間経過後の増殖率, 右: 培養 44 時間経過後

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Xu Yikun, Hirata Eri, Iizumi Yoko, Ushijima Natsumi, Kubota Keisuke, Kimura Sadahito, Maeda Yukari, Okazaki Toshiya, Yokoyama Atsuro	4. 巻 8
2. 論文標題 Single-Walled Carbon Nanotube Membranes Accelerate Active Osteogenesis in Bone Defects: Potential of Guided Bone Regeneration Membranes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Biomaterials Science and Engineering	6. 最初と最後の頁 1667 ~ 1675
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsbmaterials.1c01542	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 徐易坤、平田恵理、高田紗理、前田由佳利、木村貞仁、横山敦郎
2. 発表標題 骨再生誘導法への単層カーボンナノチューブ膜の応用
3. 学会等名 日本補綴歯科学会第130回記念学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yikun Xu, Eri Hirata, Yoko Iizumi, Yukari Maeda, Sadahito Kimura, Toshiya Okazaki, Atsuro Yokoyama
2. 発表標題 Fabrication and evaluation of single walled carbon nanotube membrane for guided bone regeneration application.
3. 学会等名 第11回ナノカーボンバイオシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sadahito Kimura, Eri Hirata, Yuta Takano, Yukari Maeda, Masatoshi Sakairi, Masako Yudasaka, Atsuro Yokoyama
2. 発表標題 Exploration of macrophage polarization on titanium coated with carbon nanohorns.
3. 学会等名 第11回ナノカーボンバイオシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平田恵理、前田由佳利、木村貞仁、横山敦郎
2. 発表標題 光殺菌性カーボンナノホーンの開発
3. 学会等名 第51回日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木村貞仁、平田恵理、前田由佳利、横山敦郎
2. 発表標題 カーボンナノホーン修飾チタン上のM1-M2マクロファージの分極
3. 学会等名 第51回日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木村貞仁、平田恵理、前田由佳利、横山敦郎
2. 発表標題 カーボンナノホーン修飾チタン上でのマクロファージの挙動と分極
3. 学会等名 日本補綴歯科学会第131回学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小西大輔、平田恵理、高野勇太、前田由佳利、木村貞仁、横山敦郎
2. 発表標題 ミノサイクリン担持カーボンナノホーンに対する近赤外光照射による放出制御
3. 学会等名 第12回ナノカーボンバイオシンポジウム
4. 発表年 2022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
---------	---------