

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23792219
 研究課題名（和文）ゾルゲル法によりバンコマイシンにて抗菌加工を施したチタンアバットメントの開発
 研究課題名（英文）Development of controlled release of vancomycin sol-gel films on titanium abutment
 研究代表者
 小林 靖宜 (KOBAYASHI YASUYOSHI)
 大阪大学・歯学部附属病院・医員
 研究者番号：50448114

研究成果の概要（和文）：チタン合金の表面にゾルゲル法を用いてバンコマイシンを含む溶液で被膜を形成させた。被膜の薬物徐放性の検討ではバンコマイシン 10% 重量濃度を超える溶液では、約 3 週間に値する薬物徐放性が確認できた。また形態学的分析では 200nm の厚みで安定した被膜の性状が獲得できることが明らかになった。被膜の抗菌性を検討するため 37℃ で保存された唾液に浸漬して時間の経過により阻止円の形成を検討したところ、14 日後から阻止円の形成が縮小された。

研究成果の概要（英文）：Sol-gel films on titanium alloy have made with vancomycin solution. In the solution of more than 10% weight concentration vancomycin, about three weeks was confirmed in the study of controlled release drug release of the film. In the morphological analysis, the stability of the films can be acquired at a thickness of 200nm revealed. To investigate the antibacterial coating, we examined the effect on the formation of the inhibition rings by immersion in a saliva 37 °C. Formation of inhibition rings was reduced after 14 days.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：インプラント 表面加工 チタン合金

1. 研究開始当初の背景

近年、インプラント体の改良および臨床手技の向上によりオッセオインテグレーションの獲得に優れたものが増えている。しかし、いまだインプラント周囲炎を防ぐ手立てはない。抗菌性を有したインプラント材質の改良には、まだ検討の余地が残されている。

本研究の目的は、抗菌加工を施したチタンを用いて、生体内を模倣した実験系でバイオフィルム形成を阻害する機能を評価する。抗菌チタンの試作品を作製して *in vitro* およ

び *in vivo* にて生体親和性を評価することである。

現在、口腔インプラント治療は歯の欠損に対する歯科治療の選択肢の一つとして欠かすことができない方法となっている。インプラント治療では、義歯のような違和感はほとんどなく、隣在歯や他の健全歯の切削の必要性がないなどの利点により広く取り入れられている。最近ではインプラント体の改良と臨床症例の増加により長期間にわたって使用されている例も増加してきている。それに

伴い、天然歯における歯周炎と同様にプラークによる炎症で発現するインプラント周囲炎が問題となっている。

口腔インプラントの多くは、一口腔内において天然歯と混在した環境で応用されている。しかし、天然歯は、歯肉、セメント質、歯根膜と歯槽骨で維持されているが、インプラントでは、歯肉と歯槽骨とくに歯槽骨とインプラントとのオッセオインテグレーションで維持されている。よってこの周囲組織の違いにより、天然歯に比べ生体防御能に劣るインプラントでは骨破壊が進行しやすいとされている。また一方で、インプラント体の表面はオッセオインテグレーションを獲得するために酸処理やチタンブラストなどの表面処理が施されたラフサーフェスが主流になっている。このことかえって口腔内細菌で形成されたバイオフィルムの除去を困難なものにし、インプラント周囲炎の進行を促している。

口腔インプラントでは一般的にインプラント体は骨や口腔粘膜といった生体内に存在するが、上部構造は口腔という非常に多くの細菌に暴露する環境下に存在する。これは医学的に非常に特殊な環境であり、長期安定性を図るためには細菌による生体内への侵襲を防ぐ必要がある。口腔インプラントにおいて生体と口腔を結ぶ位置で存在するのがアバットメントである。そこで申請者はアバットメントに抗菌性をもたせることで細菌による侵襲を妨げることができないかと考えた。

2. 研究の目的

抗菌性を有したチタンの開発は様々な方法で検討されている。バンコマイシンは抗菌性の高い物質として知られている。このバンコマイシンを用いて、新たにチタン表面にコーティングする方法としてゾルゲル法 (sol-gels) の応用が試みられている¹⁾。整形外科領域でもインプラント治療は広く応用され口腔内と同様に細菌感染による骨破壊は大きな問題であり、抗菌作用をもったチタン素材の開発も検討されている。多くの研究では *Staphylococcus aureus* や *Staphylococcus epidermidis* といった皮膚常在菌で検討を行っているが、*Porphyromonas gingivalis* や *Actinobacillus actinomycetemcomitans* などの歯周病の原因となる口腔内細菌に対する効果はあまり検討されていない。また現段階では、口腔インプラントにおいてオッセオインテグレーションを得るために表面処理を施したアバットメントに抗菌性を持たせることが、オッセオインテグレーションにどのような影響を及ぼすかということに関してはあまり検討が重ねられていない。

本研究では、抗菌加工を施したチタンアバットメントの開発をするため、口腔内細菌に対する抗菌能の分析と抗菌加工を施したチタン表面との生体親和性の検討を図る。



3. 研究の方法

本研究の目的は、抗菌加工を施したチタンアバットメントの製作であった。そのため、加工されたチタンの抗菌性と口腔内周囲組織に対する生体親和性の評価が必要になった。まず、Ti-6Al-4V チタン合金にゾルゲル法 (sol-gels) を用いバンコマイシンをコーティングした抗菌加工チタンを作製する。チタン表面での口腔内細菌培養を行い、細菌の接着、増殖とバイオフィルムの形成量を評価した。

Ti-6Al-4V チタン合金表面にゾルゲル法 (sol-gels) を用いバンコマイシンをコーティングしたチタン合金の試料を作製した。ゾルゲル法の特長として帯電させた溶液にバンコマイシンを溶解させる必要があった。最初にゾルの粘稠度およびバンコマイシン溶液を加える事での組成の変化について検討が必要であった。薬物徐放性に関してはコーティングされたバンコマイシンが有効な効果を示す濃度の検討を行った。1%~20%重量濃度のバンコマイシン溶液を作製してゾルゲル法により被膜の形成を行った。そして被膜の性状、薬物徐放性および耐久性について検討を重ねた。

① ゾルの組成、粘調度および性状の検討

ゾルの主成分であるオルトケイ酸テトラエチル (以下 TEOS) と水の比率、 $H_2O/TEOS$ 比を 1~10 で形成した被膜の性状について検討した。また浸漬速度とゾルの粘調度から形成される被膜の厚みが変わる。厚みによる被膜の性状について検討した。

② バンコマイシン溶液の濃度

1%~20%のバンコマイシン溶液をスポンジに浸漬して寒天培地上で口腔内細菌への効果を検討した。

③ コーティング層の濃度

1%~20%重量濃度での抗菌作用の差を評価するため、口腔内細菌である *Streptococcus mutans*、*Streptococcus mitis* および *Streptococcus sobrinus* を含む液体培地内に試作チタンを浸漬して1, 3, 10時間での菌量を吸光度計で測定し、OD値を比較した。

④ コーティング性状変化の観察

10℃と60℃の水に各1分間の浸漬を繰り返すサーマルサイクル試験を1000~50,000回負荷した後、また、分光学的にバンコマイシンを定量し、薬物徐放性の有無を検討した。

⑤ コーティングの除放性および変性の検討

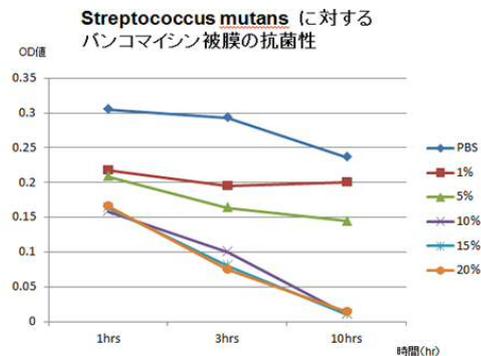
10%~20%重量濃度のコーティングを施した試料を作製して100, 140 および200 MPaの静水圧加圧を行い、位相差顕微鏡にて表面の画像解析を行った。また、分光学的にバンコマイシンを定量し、その除放性の有無を検討した。

4. 研究成果

本研究は、円盤状および短冊状のプレートに裁断したTi-6Al-4Vチタン合金を用いて実験を進めた。表面にはゾルゲル法を用いてバンコマイシンを含む溶液で被膜を施した。まずゾルの主成分であるオルトケイ酸テトラエチル (TEOS) と水の比率について検討した。H₂O/TEOS比が3の濃度より高濃度な溶液を用いた場合にはゾルが濁る現象が認められた。そして最終的にはゾルはH₂O/TEOS比が5で透明な状態に保つことができた。調整されたゾルを用いてバンコマイシンの濃度の調整を行い、チタン合金上に被膜を作製した。予め、1%~20%のバンコマイシン溶液をスポンジに浸漬して寒天培地上で口腔内細菌への効果を検討したところ5%以上の濃度ではいずれの濃度でも十分な大きさの阻止円の形成が認められた。そこで1%~20%重量濃度での抗菌作用の差を評価するため、*Streptococcus mutans*、*Streptococcus mitis* および *Streptococcus sobrinus* を含む液体培地内に試作チタンを浸漬して1, 3, 10時間での菌量を吸光度計で測定し、OD値を比較した。すると10%以上の濃度ではいずれの細菌に対しても強い抗菌作用を示された。

チタン合金表面の被膜の性状を検討したところバンコマイシン濃度依存的に変化が現れた。サーマルサイクルを経て被膜からの薬物徐放性を検討した。バンコマイシン10%重量濃度を超える溶液では、約3週間に値する30,000回までは薬物徐放性が確認できた。またコーティングを行う際のゾルの粘調度

を検討した。高粘度になればコーティングの厚みが増すのだが、電子顕微鏡での形態学的分析では250nmを超えるものでは微小なクラックが確認された。このことから200nmでは安定した被膜の性状が獲得できることが明らかになった。そしてバンコマイシン10%重量濃度のゾルで被膜を施したチタン合金を用いて抗菌作用について検討した。コーティングを施した直後のチタン合金を検討するため健康成人の口腔内から採取したプラークより細菌懸濁液を作製し、寒天培地に播種した。円状のチタンプレートに合わせ阻止円の形成が確認できた。37℃で保存された唾液に浸漬して時間の経過により阻止円の形成を検討したところ、14日後当たりから阻止円の形成が縮小された。



10%~20%重量濃度のコーティングを施した試料を作製して100, 140 および200 MPaの静水圧加圧を3分間行い、位相差顕微鏡にて表面の画像解析を行った。すると被膜の著しい欠落が認められた。また、分光学的にバンコマイシンを定量し、その除放性の有無を検討したが100MPaでわずかな徐放性を示すのみであった。このことから被膜は強い圧力にさらされると欠落することがわかった。

以上の結果をまとめると本研究で行ったチタン合金の表面処理では、約3週間の薬物徐放性があり、14日目ごろから徐放性の低下が認められた。これはアバットメントに採用する場合、創傷治癒期では適応できるものと考えられる。また被膜の強度の改良が出来ればもう少し長期での口腔内の使用に近づける事ができる。今後は生体に対する親和性および生体内での機能を検討が望まれる。

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）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 靖宜 (KOBAYASHI YASUYOSHI)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：50448114