

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670836

研究課題名(和文)インプラント周囲炎の革新的予防・治療薬の開発と実用化への挑戦

研究課題名(英文)Development of antibacterial materials for prevention and treatment of peri-implantitis

研究代表者

吉田 靖弘 (YOSHIDA, Yasuhiro)

北海道大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：90281162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：口腔インプラントは、今や歯牙喪失部位の補綴処置における重要な選択肢であり、歯科医師にとって一般的な治療法となった。口腔インプラントを用いた補綴治療を施した患者数の増加が、このことを物語っている。しかし、全く問題がない訳ではない。例えばインプラント周囲炎は、口腔インプラント喪失につながる重篤な疾患であるものの、予防法・治療法が限られている。我々は殺菌剤である塩化セチルピリジニウム(CPC)と多糖誘導体リン酸化プルランを主成分としたインプラント周囲炎の予防・治療用材料を試作し、細菌実験により市販口腔ケア製品を超える優れた抗菌効果を有することを明らかにした。今後はこれらの成果を基に実用化を目指す。

研究成果の概要(英文)：Dental implants have become modern option for dentists to replace missing teeth, resulting in an increasing percentage of the adult population with implant supported prosthesis. However, they have still some serious problems. For example, peri-implantitis is well-known as a destructive inflammatory disease through infectious of soft and hard tissues surrounding dental implants. It causes bone loss around an osseointegrated implant with increasing risk of implant failure. Therefore, we developed experimental materials containing cetylpyridinium chloride (CPC) and phosphopullulan to prevent and treat peri-implantitis. Microbiological examination revealed that Ti treated with the experimental materials showed excellent antibacterial effect. These results are useful to develop new commercially available antibacterial materials for prevention and treatment of peri-implantitis.

研究分野：歯科理工学

キーワード：インプラント インプラント周囲炎 ドラッグデリバリーシステム DDS 殺菌剤 CPC 濃度 会合

1. 研究開始当初の背景

インプラントのトラブルにまつわる報道は日増しに増え、社会的に注目を集めている。医療事故は言うまでもなく、インプラント周囲炎による不具合でも歯科医師の信用を落としかねず、歯学研究者として看過できない状況である。インプラント先進国のスウェーデンでも実に4人に1人がインプラント周囲炎に罹患していると報告されている。我が国の潜在的な患者数はさらに多いと考えられる。インプラント周囲炎のような感染症治療には抗菌薬(抗生物質)投与が有効であるが、耐性菌の問題から長期使用は禁忌である。一方、塩化セチルピリジニウム(CPC)のような殺菌剤は長期使用が可能であるが、非特異的であるため高濃度では周囲の粘膜に為害作用を及ぼす

2. 研究の目的

研究代表者は上記の問題を解決するため、キャリアの分子構造とCPCの混合比を最適化し、高濃度では抗菌効果や為害性を発現せず、低濃度になって初めて抗菌効果を発現するインテリジェントDDSを開発した。本研究では、研究代表者の開発した低濃度機能発現型DDSに更なる改良を加え、チタン接着性を付与することによりインプラント/歯肉接合部に到達し、低濃度になって初めて抗菌効果を発現するインプラント周囲炎予防・治療用DDSの開発を目指した。

3. 研究の方法

研究代表者が開発した多糖誘導体リン酸化プルランと殺菌剤である塩化セチルピリジニウム(CPC)の複合体が、濃度変化に伴いイオン結合から疎水性相互作用へと会合状態を変えることに着目し、(1)インプラントの母材であるチタンへのCPC送達性ならびに(2)CPCとの会合体の構造変化と抗菌効果を検討することにより、濃度を検知して抗菌効果を発現するインプラント周囲炎の予防・治療薬創製を目指した。リン酸化プルランを種々の合成法で作製し、実験に供した。3種類の試作DDS(試作A,B,C)の機能は、細菌試験により、市販口腔ケア製品(製品A,B,)CPC0.01%溶液と比較した。試作A,B,Cについては、CPC濃度が0.01%になるよう希釈した。また、製品A,Bは市販品の規定濃度で調整した。それぞれの溶液にチタンプレート30分間浸漬し、超純水で2回洗浄し、エアでプレート表面の水滴を飛ばした。1.0×10⁵CFUになるように調製した菌液にプレートを浸漬し、37℃、12時間培養後、ルシフェールHSキット(キッコマン)でATP活性を測定し、増殖した細菌量を比較した。

なお、詳細な実験方法、特に合成条件や試薬名に関しては、特許出願を検討中であること、製品化時のノウハウとして非公開となりうる可能性も残っていることから本報告から割愛する。

4. 研究成果

図1に12時間後のプレートの写真を、また図2にATP活性の測定結果を示す。製品A,BやCPC0.01%溶液、PBSで表面処理したチタンプレート上には菌の増殖し濁度が上昇しているのが認められるものの、試作A,B,Cではほとんどblankと変わらず、優れた抗菌効果を有することが示唆された。

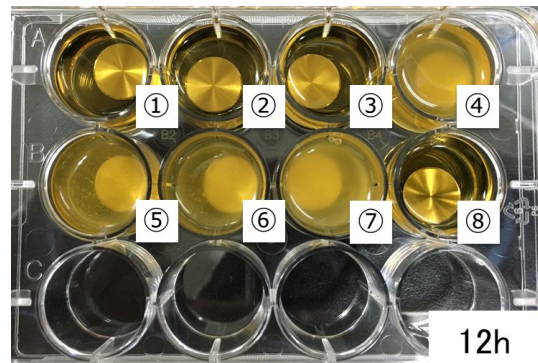


図1 12時間後のプレートの写真。試作A, blank, 試作C, 製品A, 製品B, CPC0.01%溶液, PBS, 試作B。製品AやCPC0.01%溶液では菌が増殖した。

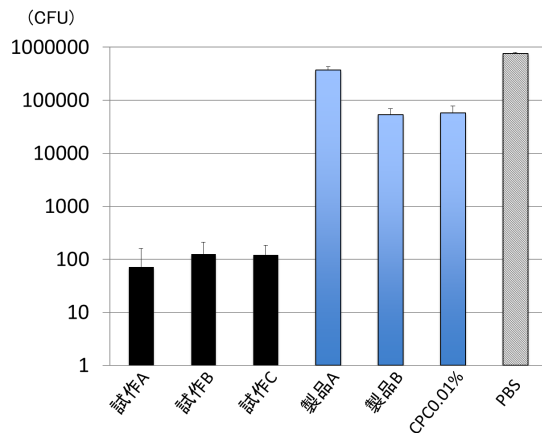


図2 ATP活性の測定結果。

以上より、今回の実験に供した市販品やCPCのみの溶液は、チタン表面に殺菌剤を留める能力がなく、これに対して今回の試作品は、チタンへの殺菌剤デリバリー能に優れていることが示唆された。

またこれまでの研究では試薬を用いた有機合成の方が過熱する場合に比べてリン酸化度や分子量を規格化しやすいこと、さらに、大きな分子量がえられる反面、水溶性は劣る。これが殺菌剤である塩化セチルピリジニウム(CPC)と複合し、製剤化する上で問題であった。そこで、170℃加熱合成したリン酸化プルランを中心に開発を進めてきたが、リン酸化度や分子量の制御が難しく、製品に使用するような安定供給が難しいことがわかった。加熱合成したリン酸化プルランに比べて、試薬を用いて常温合成したリン酸化プルランは、リン酸化率や分子量がコントロールしやすく、製品化には向いている。反面、試

薬を用いた常温合成のリン酸化プルランは、加熱合成より得られた物に、キャリアとしての性能で劣るという弱点が克服できず、実用化という点で障害があった。しかし、合成条件を詳細に検討した結果、より安価に低分子のリン酸化プルランを得る合成法を見出すことができ、製品化に向けた大量合成への突破口も開けた。さらに、添加物に関しても、抗菌機能を落とさない賦形剤と添加量に関して有用な知見が得られた。

今回、開発した技術はインプラント周囲炎予防・治療に極めて有用である。そこで本研究より得られた成果を基に、企業と協議を繰り返し、製品化する方向で企業内でも製造法などの検討が進められることとなった。今後はこれらの成果を基に実用化を目指す予定である。これに伴い、特許出願も検討していく必要があるため、結果に関する詳細な情報は割愛する。

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27件、全て査読有り)

1. S. Abe*, E. Seitoku, N. Iwadera, Y. Hamba, S. Yamagata, T. Akasaka, T. Kusaka, S. Inoue, Y. Yawaka, J. Iida, H. Sano, T. Yonezawa, and Y. Yoshida
“Estimation of biocompatibility of nano-sized ceramic particles with osteoblasts, osteosarcomas and hepatocytes by static and time-lapse observation” *J. Biomedical Nanotechnology*, **12**, 472-480 (2016)
2. S. Abe*, S. Kawano, Y. Toida, M. Nakamura, S. Inoue, Y. Yoshida, H. Sano, H. Kawabata, and H. Tachikawa
“Electronic States of Alkyl Radical-Functionalized C₂₀ Fullerene: Density Functional Theory (DFT) Study” *Jpn. J. Appl. Phys.*, **55**, p03DD0301-04, (2016)
3. M. Mutoh, S. Abe*, T. Kusaka, M. Nakamura, Y. Yoshida, J. Iida, and H. Tachikawa
“Density Functional Theory (DFT) Study on Ternary Interaction System of Fluorinated Ethylene Carbonate, Li⁺, and Graphene Model” *ATOMS*, **4**, p401-408 (2016)
4. E. Seitoku, S. Abe*, T. Kusaka, S. Inoue, H. Sano and Y. Yoshida
“Cytocompatibility on HeLa cells under several nano-sized ceramics particles exposure” *J. Nanoscience Nanotechnology*, **16**, p3373-3377 (2016)
5. M. Sugiyama, A. Saeki, A. Hasebe, R. Kamesaki, Y. Yoshida, Y. Kitagawa, T. Suzuki, K. Shibata
“Activation of inflammasomes in dendritic cells and macrophages by Mycoplasma salivarium” *Molecular Oral Microbiology*, **31**, p259-269 (2016)
6. M. Hanabusa, K. Yoshihara, Y. Yoshida, T. Okihara, T. Yamamoto, Y. Momoi, B. Van Meerbeek*
“Interference of functional monomers with polymerization efficiency of adhesives” *Eur. J. Oral Sci.* **124**, p204-209 (2016)
7. M. Inokoshi, K. Yoshihara, N. Nagaoka, M. Nakanishi, J. De Munck, S. Minakuchi, K. Vanmeensel, F. Zhang, Y. Yoshida, J. Vleugels, I. Naert, B. Van Meerbeek*
“Structural & chemical analysis of the zirconia/veneering ceramic interface” *J. Dental Research*, **95**, p102-109 (2016)
8. N. Kiyama, S. Abe*, S. Yamagata, Y. Yoshida, and J. Iida
“Evaluation of the biocompatibility of ceramic nanoparticles with A549 lung epithelial cells” *Nanoscience and Nanotechnology Letters*, (in press, 9999)
9. S. Tsuchiya, S. Abe*, Y. Era, Y. Nakagawa, M. Nakamura, T. Kusaka, Y. Yoshida, T. Yonezawa, and J. Iida
“Assessment of size and morphological effects of ceramics nanoparticles on their biocompatibility” *Nanoscience and Nanotechnology Letters*, (in press, 9999)
10. S. Abe*, N. Iwadera, M. Mutoh, T. Katsurayama, S. Morimoto, K. Nakanishi, T. Akasaka, S. Inoue, Y. Yawaka, J. Iida, and Y. Yoshida
“Cytocompatibility of ceramic nanoparticles to various types of cells” *Key Engineerings and Materials*, (in press, 9999)
11. Nakanishi*, S. Abe, S. Yamagata, Y. Yoshida, and J. Iida
“Effects of surface property of montmorillonite for their cytocompatibility” *Key Engineerings and Materials*, (in press, 9999)

12. K. Nakanishi*, S. Yamagata, T. Akasaka, S. Abe, Y. Yoshida, and J. Iida
 “Development of poly(L-lactic acid)/organically modified montmorillonite nanocomposites for the fabrication of orthodontic anchoring screws”
J. Nanoscience Nanotechnology, (accepted, 9999)
13. S. Ting*, F. Pan, J. Fu, S. Kakuda, S. Hoshika, T. Ikeda, Y. Nakaoki, S. Abe, Y. Yoshida and H. Sano
 “Effect of different remaining dentin thickness on Micro-tensile bond strength of current adhesive systems”
Dent. Mater. J., **34**, p181-188 (2015)
14. M. Mutoh, S. Abe*, A. Hyono, H. Matsuura, K. Nakanishi, K. Kawai, M. Nakamura, S. Inoue, Y. Yoshida, J. Iida, and T. Yonezawa
 “Electroconductive pretreatment of several types of non-conductive wet biological samples for SEM using a room temperature ionic liquid: Simple and rapid conductive preparation”
Nano Biomedicine, **7**, p72-80 (2015)
15. M. Mutoh, S. Abe*, K. Nakayama, S. Yoshizawa, M. Nakamura, T. Kusaka, Y. Yoshida, J. Iida, and T. Takada
 “Simple size-controlled preparation of micro-/nano-sized fullerene C₆₀ particles using different chain-length diaminoalkane compounds”
Nano Biomedicine, **7**, p87-92 (2015)
16. M. Oouchi, A. Hasebe, H. Hata, T. Segawa, Y. Yamazaki, Y. Yoshida, Y. Kitagawa, K. Shibata
 “Age-related alteration of expression and function of TLRs and NK activity in oral candidiasis”
Oral Diseases, **21**, p645-651 (2015)
17. M. Inokoshi, K. Yoshihara, N. Nagaoka, M. Nakanishi, J. De Munck, S. Minakuchi, K. Vanmeensel, F. Zhang, Y. Yoshida, J. Vleugels, I. Naert, B. Van Meerbeek
 “Structural and Chemical Analysis of the Zirconia–Veneering Ceramic Interface”
J. Dental Research, **95**, p102-109 (2015)
18. K. Yoshihara, N. Nagaoka, T. Okihara, M. Kuroboshi, S. Hayakawa, Y. Maruo, G. Nishigawa, J. De Munck, Y. Yoshida, B. Van Meerbeek*
 “Functional monomer impurity affects adhesive performance”
Dental Materials, **31**, p1493-1501 (2015)
19. K. Nakanishi*, S. Yamagata, T. Akasaka, S. Abe, Y. Yoshida and J. Iida
 “Preparation of a poly(lactic acid)/montmorillonite nanocomposite”
Key Engineerings and Materials, **631**, p151-155, (2015)
20. T. Takahata, T. Okihara, Y. Yoshida, K. Yoshihara, Y. Shiozaki, A. Yoshida, K. Yamane, N. Watanabe, M. Yoshimura, M. Nakamura, M. Irie, B. Van Meerbeek, M. Tanaka, T. Ozaki, A. Matsukawa*
 “Bone engineering by phosphorylated-pullulan and β -TCP composite”
Biomedical Materials, **10**, 65009 (2015)
21. 吉原久美子*, 長岡紀幸, 井上哲, 吉田靖弘
 “リン酸系モノマーのアパタイト・象牙質への化学的相互作用”
接着歯学, **33**, p196-203 (2015)
22. S. Abe*, A. Hyono, K. Kawai, K. Nakamura, Y. Yawaka, Y. Yoshida, and T. Yonezawa
 “Simple and rapid conductive preparation of wet biological samples for SEM observation: Use of an asymmetrical choline-like room temperature ionic liquid as a visualizing agent”
Nano Biomedicine, **6**, p41-46 (2014)
23. T. Mazaki, Y. Shiozaki, K. Yamane, A. Yoshida, M. Nakamura, Y. Yoshida, D. Zhou, T. Kitajima, M. Tanaka, Y. Ito, T. Ozaki, A. Matsukawa
 “A novel, visible light-induced, rapidly cross-linkable gelatin scaffold for osteochondral tissue engineering”
Scientific Reports, **4**, p4457, (2014)
24. K. Yoshihara, Y. Yoshida, S. Hayakawa, N. Nagaoka, S. Kamenoue, T. Okihara, T. Ogawa, M. Nakamura, A. Osaka, B. Van Meerbeek
 “Novel fluoro-carbon functional monomer for dental bonding”
J. Dental Research, **93**, p189-194 (2014)
25. A. Mine, J. De Munk, M.V. Cardoso, K.L. Van Landuyt, A. Poitevin, A. Van Endo, M. Matsumoto, Y. Yoshida, T. Kuboki, H. Yatani, B. Van Meerbeek*
 “Dentin-smear remains at self-etch adhesive interface”
Dental Materials, **30**, p1147-1153 (2014)

26. T. Mazaki, T. Kitajima, Y. Shiozaki, M., Sato, M. Mino, A. Yoshida, M. Nakamura, Y. Yoshida, M. Tanaka, T. Ozaki, A. Matsukawa, Y. Ito
“In Vitro and in vivo enhanced osteogenesis by kaempferol found by a high-throughput assay using human mesenchymal stromal cells” *Journal of Functional Foods*, **6**, p241-247, (2014)

27. A. Yamagami, N. Nagaoka, K. Yoshihara, M. Nakamura, H. Shirai, T. Matsumoto, K. Suzuki, Y. Yoshida*
“Ultra-structural evaluation of an anodic oxidated titanium dental implant” in its current form for publication”
Dent Mater J., **33**, p828-834 (2014)

[学会発表](計19件)

1. 阿部薫明・沖原巧・赤坂 司・吉田靖弘
“リン酸化多糖を用いた薬剤徐放制御材料の開発”,
日本歯科理工学会学術講演会,九州大学(福岡県・福岡市東区)(2016.4.17)

2. 江良裕子・阿部薫明・川上隼人・河合功治・赤坂 司・吉田靖弘
“イオン液体による SEM 試料の迅速・簡便前処理法 - 湿潤生体試料の「ありのまま」観察 - “
日本歯科理工学会学術講演会,九州大学(福岡県・福岡市東区)(2016.4.17)

3. S. Abe, S. Tsuchiya, Y. Yoshida, and J. Iida
“Chemical modification on dental orthodontic wire for suppression of metal ions elution”
2nd World Congress and Expo on Nanotechnology and Material Science, Dubai, UAE, (2016.4.5)

4. S. Yoshizawa, S. Abe, T. Kusaka, M. Nakamura, Y. Yoshida, J. Iida, and H. Tachikawa
“Electronic States of Alkyl Radical Functionalized Fullerene (R-C₆₀): Density Functional Theory (DFT) Study “
ISPlasma, Nagoya, JAPAN, (2016.3.8)

5. 阿部薫明・吉沢早織・吉田靖弘・飯田順一郎
“酵素モデル化合物を用いた石灰化反応制御”,
化学系学協会北海道支部 2016 冬季研究発表会,北海道大学(北海道・札幌市北区)(2016.1.20)

6. M. Mutoh, S. Abe, S. Yoshizawa, K.

Nakayama, T. Kiba, Y. Yoshida, J. Iida, and T. Takada

“Preparation of size- and shape-controlled water-dispersible fullerene nanoparticles and their application in biological fields”,
第 25 回日本 MRS 年次大会, 横浜マリントワー, 神奈川県民ホール, 産業貿易センタービル, 波止場会館, 万国橋会議センター, 横浜市開港記念会館, 情報文化センター(神奈川県・横浜市中区)(2015.12.9)

7. T. Okihara, S. Abe, Y. Okajima, S. Kamenoue, D. Yamamoto, and Y. Yoshida
“Effective controlled drug release system using phosphorylated pullulans”,
NanoMED 2015, Manchester, UK, (2015.11.24)

8. S. Abe, N. Iwadera, M. Mutoh, T. Katsurayama, S. Morimoto, Y. Yawaka, J. Iida, and Y. Yoshida
“Cytocompatibility of nano-sized ceramics particles on several cells”,
Bioceramics 2015, Bali, INDONESIA, (2015.10.27)

9. S. Tsuchiya, N. Kiyama, S. Abe, T. Kiba, A. Murayama, Y. Yoshida, and J. Iida
“Size, morphology and surface property effects of ceramics nanoparticles on their biocompatibility”
NanoKOREA 2015, Seoul, KOREA, (2015.7.14)

10. S. Abe, Simpei Kawano, Yu Toida, Satoshi Inoue, Hidehiko Sano, and Y. Yoshida
“Interaction of alkyl radical with fullerene (C₆₀): Density Functional Theory (DFT) study”,
M&BE 2015, Tokyo, JAPAN, (2015.6.23)

11. S. Abe, N. Kiyama, T. Kiba, A. Murayama, J. Iida, and Y. Yoshida:
“Cytocompatibility of photoluminescent ceramics nanoparticles” IC ME & D 2015. Seoul, KOREA, (2015.5.20)

12. S. Abe, N. Kiyama, T. Kiba, A. Murayama, J. Iida, and Y. Yoshida
“Surface modification effects of photoluminescent ceramics nanoparticles on their biocompatibility”,
ICNME 2014, Kobe, JAPAN, (2014.12.18)

13. S. Abe, E. Seitoku, Y. Hamba, N. Iwadera, T. Aksaka, S. Yamagata, Y. Yawaka, J. Iida, H. Sano, and Y. Yoshida:
“Biocompatibility of several nano-sized ceramics particles: In vitro study”,
Bioceramics 2014, Barcelona, SPAIN,

(2014. 11.8)

14. S. Abe, E. Seitoku, H. Sano, and Y. Yoshida

“Cytocompatibility of several nano-sized metal oxide particles”,
AsiaNANO 2014, Jeju, KOREA (2014. 10.28)

15. S. Abe, K. Kawai, and Y. Yoshida

“SEM observation of several biological samples using a hydrophilic asymmetrical tetraammonium-type room temperature ionic liquid as a visualizing agent”
International Microscopy Congress 2014, Prague, CZECH, (2014. 10.8)

16. 阿部 薫明, 金子恒太郎, 河合 功治, 赤坂司, 吉田 靖弘

“イオン液体によるタンパク質保存液の試作：タンパク質の常温長期安定化”
第 64 回日本歯科理工学会, アステールプラザ (広島県・広島市中区)(2014.10.5)

17. S. Abe, A. Hyono, N. Kaneko, K. Kaneko, K. Kawai, and Y. Yoshida

“Effect of chemical structure of hydrophilic tetraammonium-type ionic liquids for stability of higher-order structure of proteins”
第 52 回日本生物物理学会, 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市東区) (2014.9.14)

18. 金子恒太郎, 河合 功治, 矢下垂紀良, 阿部 薫明, 吉田 靖弘

“生体触媒安定化剤への利用に向けた高溶解性イオン液体中での酵素の長期安定性の検討”
第 15 回日本蛋白質科学会年会, あわぎんホール (徳島県・徳島市)(2014.6.25)

19. 阿部薫明, 岩寺信喜, 半場悠介, 山方 秀一, 赤坂司, 内田由樹, 成島隆, 巨理文夫, 古月文志, 八若保孝, 飯田順一郎, 高田知哉, 米澤徹, 吉田靖弘

“マイクロ・ナノ物質の細胞刺激性の検討”
第 8 回ナノ・バイオメディカル学会, ホテルグランピア和歌山 (和歌山県・和歌山市) (2014.5.2)

〔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〕

特記事項なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

吉田 靖弘 (YOSHIDA, Yasuhiro)

北海道大学 歯学研究科 教授

研究者番号 : 90281162

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし