

令和 6 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K10025

研究課題名(和文) インプラント周囲炎治療を可能とする光応答性ナノカーボンインプラントの開発

研究課題名(英文) Development of Photoresponsive Nanocarbon Implants to Treat Peri-implantitis

研究代表者

平田 恵理 (HIRATA, Eri)

北海道大学・歯学研究院・助教

研究者番号：10722019

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：カーボンナノ物質(CNMs)は優れた特性を有し、医療分野での応用が期待される。本研究では、CNMsをインプラント周囲炎の治療法に応用するため1)チタン表面にカーボンナノホーン(CNHs)を固着させた骨伝導性材料、2)カーボンナノチューブ(CNTs)膜状材料、3)抗生物質/CNHs抗菌性複合体、4)光増感剤/CNHsの光線力学抗菌性材料を開発した。評価の結果、1)CNHs/TiO<sub>2</sub>はチタンより骨伝導能が優れ、2)CNT膜は骨形成亢進、3)抗生物質/CNHsは抗菌活性を示し近赤外光で増強、4)光増感剤/CNHsは一重項酸素発生により強力な光線力学抗菌効果を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発したカーボンナノ材料を利用した革新的なインプラント材料は、従来材料の課題を克服する可能性を秘めている。骨伝導性に優れるCNHコーティングチタンは、早期の骨親和性を実現し、CNTメンブレンは効率的な骨再生を促進する。一方、抗生物質やフォトセンサー分子との複合化によりインプラント周囲炎に対する新たな治療法の開発が期待できる。これらの材料は、インプラント治療の成功率向上と合併症リスク低減に寄与し、患者のQOL向上が見込まれる。さらに抗菌材料の応用範囲は、医療分野にとどまらず、環境や食品分野などへも広がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Carbon nanomaterials (CNMs) have excellent properties for biomedical use. Previous studies showed potential for dental implant applications, but treating peri-implantitis remains challenging.

This research developed: 1) Bone-conductive CNH/TiO<sub>2</sub> coatings, 2) CNT membranes, 3) Antimicrobial CNH/antibiotic composites, 4) Photodynamic antimicrobial CNH/photosensitizer composites. Evaluations showed: 1) CNH/TiO<sub>2</sub> enhanced bone conductivity over uncoated titanium. 2) CNT membranes promoted osteoblast growth and bone formation. 3) Antibiotic/CNH composites exhibited potent antimicrobial activity enhanced by near-infrared light. 4) Photosensitizer/CNH generated singlet oxygen for strong photodynamic antimicrobial effects. These unique CNM-based materials show potential for improving dental implant integration and combating infections.

研究分野：ナノバイオサイエンス

キーワード：ナノカーボン インプラント周囲炎 骨 インプラント カーボンナノホーン カーボンナノチューブ

## 1. 研究開始当初の背景

カーボンナノチューブ(CNTs),カーボンナノホーン(CNHs)等のカーボンナノ物質(CNMs)は炭素のみからなる新素材であり,物理的特性および化学的安定性から医学歯学領域を含むバイオ領域において基礎研究が開始されている.申請者はこれまでに,CNMsの細胞培養単体やインプラントの表面修飾(Hirata et al. *J Biomed Mater Res B* 2009, Hirata et al. *J Biomed Mater Res B* 2010, Hirata et al. *Appl Sur Sci* 2011, Hirata et al. *Carbon* 2011, Inoue, Hirata et al. *Key Eng Mater* 2013, Hirata et al. *Nanotechnology* 2013),CNHsを介した骨再生のメカニズム(Hirata et al. *Nanoscale* 2016),局所埋入したCNTsの体内動態(Hirata et al. *ACS Appl Nano Mater* 2019)について研究を進めており,その中でCNTsをコートしたコラーゲンスポンジは骨芽細胞の分化を促進することや,CNTsを表面修飾したチタン周囲には早期に新生骨が形成されたことを報告した.以上の結果から,CNMsのインプラントを含めた歯科応用への可能性を示してきた.

デンタルインプラントは現在広く臨床で使用されており,良好な予後が多数報告されている.一方で,インプラント周囲炎の治療法は十分には確立されておらず,インプラント臨床における大きな問題となっている.現在使用されているインプラント体の多くは,オッセオインテグレーションを促進するために,陽極酸化処理をはじめとする表面に微細な立体構造を付与する処理がなされている.そのため,インプラント体表面まで一旦炎症が及ぶと,微細構造の表面に形成されたバイオフィルムを完全に除去することが困難であることが報告されている.

現在,インプラント周囲炎に対する治療として,スケーラーなどを用いた機械的方法と,抗生物質を使用した化学的方法が行われている.しかしながら,機械的方法では,インプラント体表面の微細構造に付着した細菌を完全には除去できず,化学的方法では局所に薬剤をとどめておくことが困難な上,副作用やアレルギー,再オッセオインテグレーションを阻害するといった報告もある.近年では,メチレンブルーなどの色素溶液を注入しレーザーやLEDを照射する抗菌的光線力学療法が研究されているが,色素溶液の細胞毒性,色素沈着の可能性,さらには深部の光が到達しない部位には効果を示さないといった問題点が残されている(下図).

このように,インプラント埋入後のオッセオインテグレーションの獲得を促進するとともにインプラント周囲炎にも対処可能であるインプラントの開発は喫緊の課題である.

## 2. 研究の目的

本研究の最終的な目的は,早期のオッセオインテグレーションを獲得するとともに,インプラント周囲炎の上記治療法の問題点を改善するためのインプラントを開発することである.

本研究では,以下の3点を目的とする.

- (1) チタン表面にCNHsを固着させたCNHs/TiO<sub>2</sub>の創製と骨形成能の評価
- (2) CNTsを膜化したCNT膜の創製と骨形成能の評価
- (3) CNHsに抗生剤ミノサイクリン(MC)を担持させたMC/CNHsの創製
- (4) CNHsの光線力学効果による抗菌作用の評価と作用増強

## 3. 研究の方法

- (1) チタン表面にCNHsを固着させたCNHs/TiO<sub>2</sub>の創製と骨形成能の評価

電気泳動法によりAnTi表面にCNHをコーティングし、CNHコーティング陽極酸化チタン

(CNH/AnTi)を作製した。in vitroでは、CNH/AnTiとAnTiの骨芽細胞への影響を評価した。in vivoでは、CNH/AnTiあるいはAnTiをラット大腿骨に埋植し、7日および28日後の骨形成を観察した

(2) CNTsを膜化したCNT膜の創製と骨形成能の評価

単層CNT(SWCNT)をヒアルロン酸溶液に分散後、ろ過することでCNT膜を作製した。ラット頭蓋骨に作製した実験的骨欠損にCNTメンブレンを被覆し、8週間後の骨形成を評価した。

(3) CNHsに抗生剤ミノサイクリン(MC)を担持させたMC/CNHsの創製と近赤外光による作用増強の評価

ミノサイクリン(MC)を分散剤とし、酸化・非酸化の2種類の炭素ナノホーン(CNH)及び炭素ナノチューブ(CNT)を蒸留水に分散し、MC/CNHを得た。分散状態は紫外可視吸収スペクトル、熱重量分析、理論計算により評価した。*Streptococcus mutans (S.m)*、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans (A.a.)*を用いてMC/CNHの抗菌活性を評価した。次に、近赤外光(NIR)によって抗菌作用を増強するため、ヒアルロン酸(HA)溶液にCNHを分散させてHA/CNH溶液を調製した。次いでMC水溶液とHA/CNH溶液を混合してMC/HA/CNH溶液を作製した。吸光度測定と熱重量分析により、MCのCNHへの担持を確認した。また、MC/HA/CNHの分散安定性を評価した。MC/HA/CNHを添加した菌液にNIR照射後の細菌数、および48時間透析した後のMC/HA/CNHの細菌数を測定し、抗菌活性を評価した。

(4) CNHsの光線力学効果による抗菌作用の評価

ポルフィリン化合物を分子改良することにより710nmの光で一重項酸素( $^1O_2$ )を発生し、高い光線力学効果を示す分子(共役拡張ポルフィリン(rTPA))をCNHsに担持したCNH-rTPAを作製した。CNH-rTPA分散液にLED光(波長730nm)を照射し、Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG)を用いて $^1O_2$ 量を測定した。*Streptococcus mutans (Sm: ATCC 55677)*、*Aggregatibacter actinomycetemcomitance (Aa: ATCC2952)*の懸濁液にCNH-rTPA分散液を添加し、LED光照射15分後のColony Forming Unit (CFU)および濁度をそれぞれ測定した。細胞毒性を検討するために、マウス胎児線維芽細胞(NIH)を4時間培養した後、CNH-rTPA分散液を添加して光照射し24時間後にWST1を用いて生存細胞数を比較した。

#### 4. 研究成果

CNH/AnTiはAnTiよりも骨芽細胞の増殖を促進した。In vivoでは、CNH/AnTi表面はAnTiよりも活発な骨形成が認められた。さらに、新生骨組織がCNH/AnTiに直接接触している領域の面積はAnTiよりも有意に大きかった。このことは、骨埋入初期においてCNH/AnTi上で"contact osteogenesis"が促進されたことを示唆している。

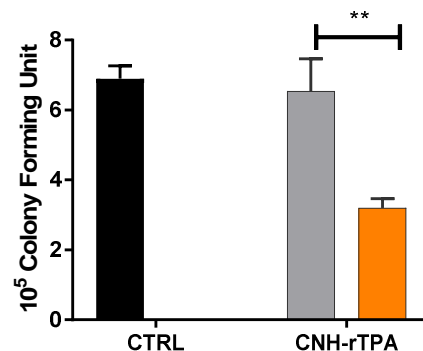
以上よりCNH/AnTiは、術後の早期骨再生に特に有利であると考えられ、CNHコーティングによりAnTiの骨伝導性が向上することが実証された。<sup>1</sup>

CNT膜はSWCNTによりナノ構造表面を有し、酸化処理により高強度と高親水性を示した。膜上では骨芽細胞は増殖するが、非骨形成細胞は増殖しなかった。膜被覆群では非被覆群よりも広範な骨形成が認められた。膜周囲へのCNTの拡散はほとんど見られなかった。これらの結果は、CNT膜が骨芽細胞に適した十分な強度、安定性、表面特性を有し、遮蔽効果により骨形成を促進することを示している。<sup>2</sup>

MC 存在下で CNH 及び CNT は良好に分散した。種々の分析結果より、MC が CNH に吸着していることが示された。MC/CNH 複合体は元の MC と同等の抗菌活性を示し、電子顕微鏡観察より複合体が菌体に直接接触していることが示された。これにより、MC がナノ粒子に保持されながら菌体へと送達されたと考えられた。<sup>3</sup>

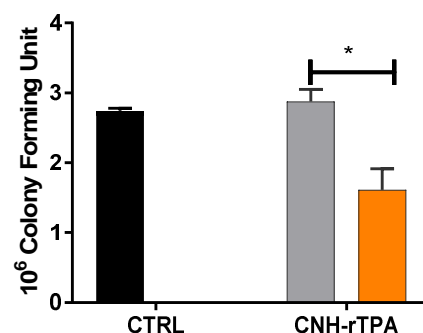
さらに、MC/HA/CNH は NIR 照射下で高い殺菌効果を示した。さらにこの効果は 48 時間透析後も持続することが分かった。これらの結果は、MC/CNH の殺菌効果が CNH の光熱効果で増強され、少なくとも 48 時間は持続することを示唆している。

SOSG による  $^1\text{O}_2$  量を経時的に測定したところ、光照射 15 分後まで  $^1\text{O}_2$  量は経時的に上昇した。CNH-rTPA 添加・光照射群では、CNH-rTPA 添加・光非照射群と比較して、Sm は 50% 減少し、Aa は 80% 減少した。光非照射群では、CNH-rTPA 添加の有無に関わらず菌数は変化しなかった。また、NIH の細胞数は、CNH-rTPA 添加、光照射のいずれの条件下においても変化しなかった。<sup>4</sup>



#### 引用文献

1. Takada, S. *et al.* Carbon nanohorn coating by electrodeposition accelerate bone formation on titanium implant. *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.* **49**, 20–29 (2021).
2. Xu, Y. *et al.* Single-Walled Carbon Nanotube Membranes Accelerate Active Osteogenesis in Bone Defects: Potential of Guided Bone Regeneration Membranes. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **8**, 1667–1675 (2022).
3. Maeda, Y. *et al.* Stable aqueous dispersions of carbon nanohorns loaded with minocycline and exhibiting antibacterial activity. *Carbon N. Y.* **166**, 36–45 (2020).
4. Hirata, E. *et al.* An antibacterial conjugate of carbon nanohorns for NIR-light mediated peri-implantitis treatment. *Chem. Commun.* **59**, 11000–11003 (2023).



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3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 & 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 -
1. 著者名 Sobhanan Jeladhara, Takano Yuta, Sugino Sakiko, Hirata Eri, Yamamura Shohei, Biju Vasudevanpillai	4. 巻 14
2. 論文標題 Multimodal CTC detection using stem cell antigen-specific immunosilica particles and immunofluorescent quantum dots	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 NPG Asia Materials	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41427-021-00353-5	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 -
1. 著者名 Satrialdi, Takano Yuta, Hirata Eri, Ushijima Natsumi, Harashima Hideyoshi, Yamada Yuma	4. 巻 3
2. 論文標題 An effective in vivo mitochondria-targeting nanocarrier combined with a -extended porphyrin-type photosensitizer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nanoscale Advances	6. 最初と最後の頁 5919 ~ 5927
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d1na00427a	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 -
1. 著者名 Maeda Yukari, Hirata Eri, Takano Yuta, Sakaguchi Norihito, Ushijima Natsumi, Saeki Ayumi, Kimura Sadahito, Shibata Ken-ichiro, Yudasaka Masako, Yokoyama Atsuro	4. 巻 166
2. 論文標題 Stable aqueous dispersions of carbon nanohorns loaded with minocycline and exhibiting antibacterial activity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Carbon	6. 最初と最後の頁 36 ~ 45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.carbon.2020.04.040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takada Sari, Hirata Eri, Sakairi Masatoshi, Miyako Eijiro, Takano Yuta, Ushijima Natsumi, Yudasaka Masako, Iijima Sumio, Yokoyama Atsuro	4. 巻 49
2. 論文標題 Carbon nanohorn coating by electrodeposition accelerate bone formation on titanium implant	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 20 ~ 29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/21691401.2020.1865388	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirata Eri, Takano Yuta, Konishi Daisuke, Maeda Yukari, Ushijima Natsumi, Yudasaka Masako, Yokoyama Atsuro	4. 巻 59
2. 論文標題 An antibacterial conjugate of carbon nanohorns for NIR-light mediated peri-implantitis treatment	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 11000 ~ 11003
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D3CC03128D	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計21件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Konishi D, Hirata E*, Takano Y, Maeda Y, Kimura S, Yudasaka M, Yokoyama A
2. 発表標題 Development of near-infrared light-responsive carbon nanohorns for control of minocycline release.
3. 学会等名 Biomaterials International (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小西大輔, 平田恵理*, 高野勇太, 前田由佳利, 横山敦郎
2. 発表標題 近赤外光照射によりミノサイクリンの放出を可能とする光機能性CNHsの開発
3. 学会等名 日本補綴歯科学会第132回学術大会
4. 発表年 2023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 カーボンナノホーン複合体の近赤外光照射による静菌効果
3. 学会等名 第13回ナノカーボンバイオサテライトシンポジウム
4. 発表年 2023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 近赤外光照射により静菌効果を発揮する光機能性カーボンナノホーンの開発
3. 学会等名 第53回日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高野 勇太*, 平田 恵理、小西 大輔、前田 由佳利、牛島 夏未、湯田坂 雅子、横山 敦郎
2. 発表標題 歯科インプラント周囲炎治療に向けた 近赤外光増感剤-カーボンナノホーン複合体の開発
3. 学会等名 日本化学会104春季年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Y. Takano*
2. 発表標題 Development of near-infrared light-controlled phototherapeutic compounds
3. 学会等名 the 14th Indian Scientists Association in Japan Annual Symposium (招待講演)
4. 発表年 2024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 木村貞仁、平田恵理、高野勇太、前田由佳利、坂入正敏、湯田坂雅子、横山敦郎
2. 発表標題 カーボンナノホーン修飾チタンにおけるマクロファージの極性変化
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

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 近赤外光照射による薬剤放出を可能とするカーボンナノホーンの開発
3. 学会等名 第52回日本口腔インプラント学会学術大会
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



1. 発表者名 平田恵理
2. 発表標題 Application of Nanocarbons as Biomaterials for Bone Regeneration
3. 学会等名 第63回 フラーレン・ナノチューブ・グラフェン総合シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2022年

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 Eri Hirata、Yuta Takano、Yukari Maeda、Sadahito Kimura、Masako Yudasaka、Atsuro Yokoyama
2. 発表標題 Development of antibacterial Carbon Nanohorns against peri-implantitis
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 木村貞仁、平田恵理、高田紗理、横山敦郎
2. 発表標題 チタン表面に修飾したカーボンナノホーンに誘導されるマクロファージ遺伝子発現解析
3. 学会等名 日本補綴歯科学会第129回学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 徐易坤、平田恵理、木村貞仁、横山敦郎
2. 発表標題 骨再生誘導法への応用を目的とした単層カーボンナノチューブ膜の開発
3. 学会等名 第50回日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木村貞仁、平田恵理、高田紗理、坂入正敏、湯田坂雅子、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培養したマクロファージの極性と遺伝子発現の検索
3. 学会等名 第10回ナノカーボンバイオシンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yikun Xu, Eri Hirata, Toshiya Okazaki, Yoko Iizumi, Sadahito Kimura, Atsuro Yokoyama
2. 発表標題 Bone formation with the single wall carbon nanotube membrane
3. 学会等名 第10回ナノカーボンバイオシンポジウム
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 埜 隆夫、菊池 正紀、田中 賢、平田 恵理	4. 発行年 2022年
2. 出版社 情報機構	5. 総ページ数 306
3. 書名 製品利用に向けたバイオマテリアル開発の基本事項と注意点 材料の特徴・材料劣化・表面解析・安全性試験・ニーズ収集	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 細胞遮断遮蔽膜とその製造方法	発明者 平田恵理、横山敦郎、岡崎俊哉、飯泉陽子	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-083834	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究分担者	横山 敦郎 (YOKOYAMA Atsuro) (20210627)	北海道大学・歯学研究院・教授  (10101)	
研究分担者	高野 勇太 (TAKANO Yuta) (60580115)	北海道大学・電子科学研究所・准教授  (10101)	

	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
研究協力者	湯田坂 雅子 (YUDASAKA Masako) (70159226)	名城大学	

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		
フランス	CNRS		