

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463210

研究課題名(和文) ナノカーボンコーティングを用いた新規歯周病治療法

研究課題名(英文) Novel periodontal therapy using nanocarbon coating procedure

研究代表者

宮治 裕史 (Miyaji, Hirofumi)

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：50372256

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ナノカーボン素材の生物学的特性を評価するために、酸化グラフェン(GO)ならびにカーボンナノチューブ(CNT)の生体親和性を検討した。またGOを用いた歯の抗菌コーティング法、ならびにGOスキャフォールドによる再生療法を開発して歯周病治療法としての有効性を検討した。その結果、GO、CNTともに低濃度において生体親和性は良好で、CNTは細胞増殖促進効果を発揮した。一方GOによる歯のコーティング処理によって抗菌性歯面を獲得することができた。また、GOスキャフォールドは細胞親和性が高く、抜歯窩や根分岐部骨欠損に埋入すると骨新生を強く促進した。以上よりナノカーボン材料は有用な医用材料であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Biocompatibility tests were performed to evaluate the biological properties of nanocarbon materials, such as graphene oxide (GO) and carbon nanotube (CNT). In addition, tooth coating procedure using GO and regenerative scaffold including GO were developed for application to periodontal therapy. Low dose of GO and CNT consistently exhibited good biocompatibility, in particular, CNT stimulated cell proliferative activity. The tooth coating procedure using GO solution provided the antimicrobial effect to the tooth surface. GO scaffold exhibited cytocompatibility and promoted tissue healing and bone formation when implanted in tooth extraction socket or furcation periodontal defect in dog. Consequently, nanocarbon materials would be available for medical application in periodontal therapy.

研究分野：歯周病学

キーワード：ナノカーボン カarbonナノチューブ 酸化グラフェン バイオマテリアル 骨再生 歯周組織再生  
抗菌性 スキャフォールド

1. 研究開始当初の背景

(1) 歯周組織再生療法の問題点と新しいコンセプトの導入

①歯周病は国民病の一つで、超高齢社会を迎えますます増加の一途をたどっている。

②失われた骨などの歯周組織を再生させる治療法が試みられているが、重度歯周病ではいまだ十分な再生は得られないのが現状であった。

③新しいコンセプトによる再生療法の開発が必須であった。

(2) ナノカーボン材料の歯周治療への応用

①ナノカーボン材料である酸化グラフェン(GO), カーボンナノチューブ(CNT)が生物学的特性を発揮することが報告された。

②ナノカーボン材料を良好に分散することで、歯根表面や様々なバイオマテリアルを均一にコーティングすることが可能となった。

2. 研究の目的

(1) 生物学的特性の解析

①GO, CNTに対する細胞, 組織親和性について検討した。

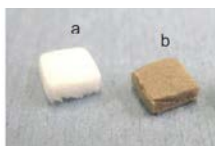
②GOの抗菌性について評価した。

③還元型酸化グラフェン(RGO)とGOの特性に差があるか検討した。

(2) 新規歯周治療法の創製。

①GOで歯をコーティングすることで、抗菌性歯面を獲得できるか検討を行った。

②GO, CNTを用いた足場材(スキャフォールド)の開発と評価を行った。



コラーゲンスポンジ (a) にGOを複合化させた新規スキャフォールド (b)。

3. 研究の方法

(1) 生物学的特性の解析

①GO, CNTフィルムを作製し、骨芽細胞を播種してSEM観察を行い、細胞増殖性を評価した。

②RGOフィルムとGOフィルムの細胞増殖性, ALP活性を評価した。

(2) 抗菌性の評価

①ヒト象牙質にGOを塗布してコーティングし, *S. mutans* を播種してSEM観察を行い, 抗菌性評価を行った。

②ラット歯牙をGOでコーティングし, プラーク付着についてSEM観察した。

(3) 新規歯周治療法の検討

①イヌ根面へGOコーティングを行い, 治癒状態を組織学的に検討した。

②GOスキャフォールドを作製し, 理工学的, 生化学的特性を評価した。

③GOスキャフォールドの細胞親和性を *in vitro* にて評価した。

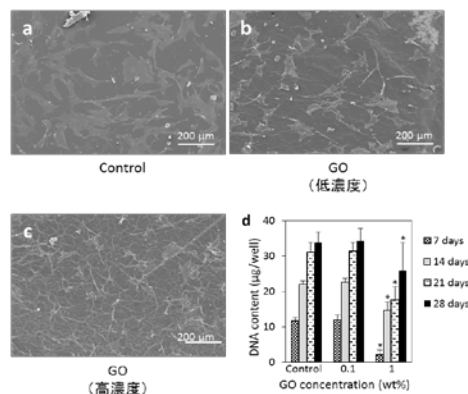
④GOスキャフォールドをラット皮下に埋植し, 細胞侵入性を免疫組織学的に評価した。

⑤GOスキャフォールドのイヌ抜歯窩での骨形成能, イヌ分岐部骨欠損での歯周組織再生効果を評価した。

4. 研究成果

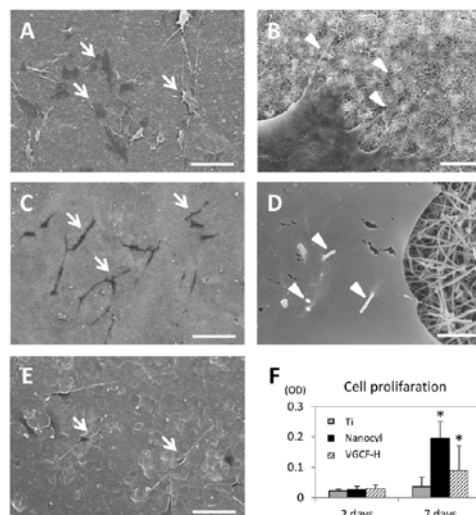
(1) 生物学的特性の解析

①GOの細胞親和性



コントロール (a), 低濃度GOフィルム (b) 上で細胞は伸展増殖したが, 高濃度 (c) では増殖は抑制された (d)。またRGOフィルムとGOフィルムを比較すると細胞増殖およびALP活性がRGOフィルムで良好であった。

②CNTの細胞親和性

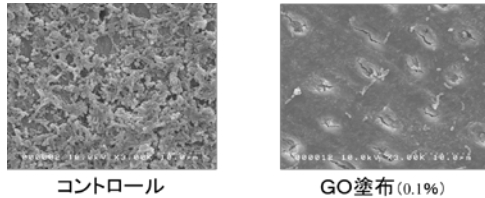


CNTはチタン上にコーティングを行った。直径の細いCNTフィルム (Nanocyl 1) (A, B) では細胞が良好に伸展し, CNTに付着していた (矢印)。直径の太いCNTフィルム (VGCF) (C, D) では細胞の伸展が少なく, VGCFが細胞に貫通す

る像が認められた(矢印). チタン表面 (E) に比べてCNTフィルムでは細胞増殖が促進された (F).

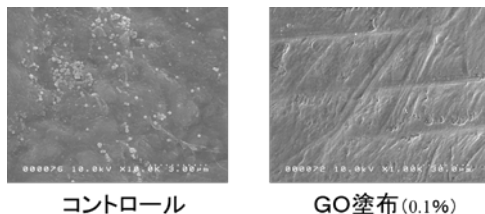
## (2) 抗菌性の評価

### ①ヒト象牙質へのGO塗布による抗菌性評価



コントロール (未処理) では, *S. mutans* によるバイオフィルムが形成されたが, GOコーティングすると菌は少なく, 増殖が抑制された.

### ②ラット歯牙へのGO塗布による抗菌性評価



コントロール (未処理) では, プラークの付着を認めたが, GOコーティングするとプラーク付着は少なかった. また, 経時的に観察した結果, 4週の長期にわたり抗菌性を示した.

## (3) 新規歯周治療法の検討

### ①イヌ根面へのGO塗布後の治癒状態の評価

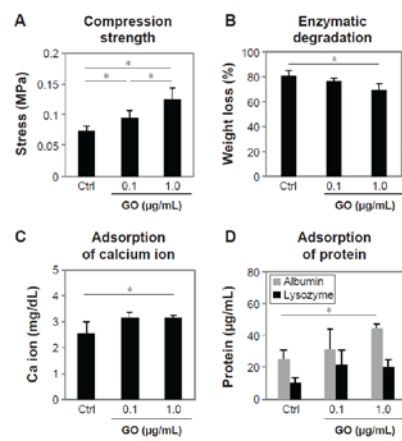


イヌ前臼歯に分岐部2級歯周組織欠損を作製して露出根面にGOコーティングを行った. その結果, 炎症性細胞浸潤は少なく歯槽骨の新生が見

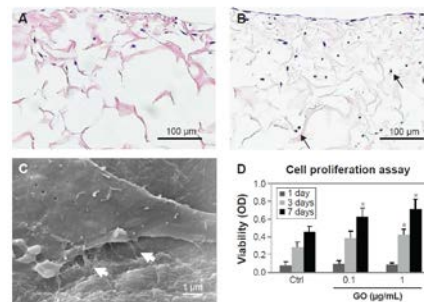
られたが, 歯肉が退縮し, 上皮が侵入した. したがってスキヤフォールドの使用が必要と考えられた.

### ②GOスキヤフォールドの特性評価

GOスキヤフォールドはコントロールのコラーゲンスポンジに比較して, 圧縮強度 (A), コラゲナーゼ抵抗性 (B), カルシウムイオン吸着性 (C), タンパク吸着性試験 (D) でいずれも優れた特性を示した.

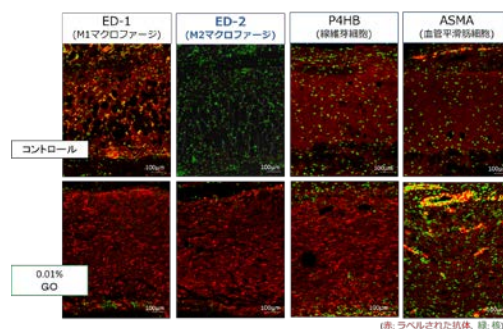


### ③GOスキヤフォールドの細胞親和性



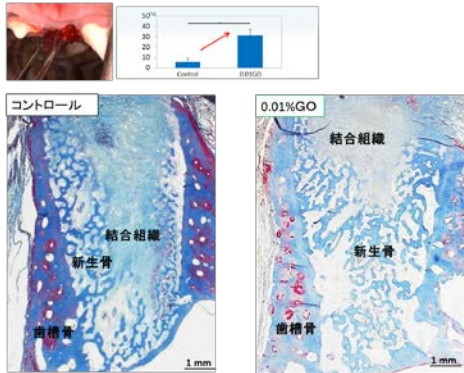
GOスキヤフォールドに培養細胞を播種したところ, コントロール (A) に比較して細胞の内部への増殖を認めた (B, 矢印). 細胞をSEM観察すると (C), フィロポディア (矢印) を認め活性が高いことを示した. 細胞増殖試験の結果, GOスキヤフォールドは有意に増殖活性が高かった (D).

### ④GOスキヤフォールドの細胞侵入性の免疫組織学的評価

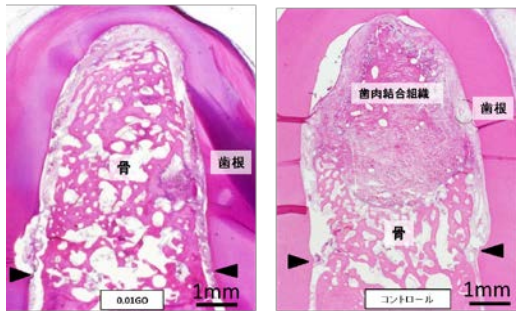


GOスキヤフォールドでは活発な細胞侵入を認め, 特に組織構築に重要な役割を果たすM2マクロファージ, 血管細胞を豊富に認めた.

### ⑤GOスキヤフォールドのイヌ抜歯窩, イヌ分岐部骨欠損への埋植と組織学的評価.



イヌ抜歯窩において、GOスキャフォールドの埋植はコントロールのコラーゲンスポンジに比較して有意に骨新生を促進した。



イヌ分岐部骨欠損でも同様にGOスキャフォールドの埋植は骨再生を促進し、歯根膜やセメント質の再生も認めた。

##### 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 9 件)

- ① Nishida.E, Miyaji.H, Kato.A, Takita.H, Iwanaga.T, Momose.T, Ogawa.K, Murakami.S, Sugaya.T, Kawanami.M, Graphene oxide scaffold accelerates cellular proliferative response and alveolar bone healing of tooth extraction socket, Int J Nanomedicine, in press, 2016, 査読有
- ② Ogawa.K, Miyaji.H, Kato.A, Kosen.Y, Momose.T, Yoshida.T, Nishida.E, Miyata.S, Murakami.S, Takita.H, Fugetsu.B, Sugaya.T, Kawanami.M, Periodontal tissue engineering by nano beta-tricalcium phosphate scaffold and fibroblast growth factor-2 in one-wall infrabony defects of dogs, J Periodont Res, in press, 2016, 査読有  
DOI: 10.1111/jre.12352
- ③ Chaochai.T, Miyaji.H, Yoshida.T, Nishida.E, Furuike.T, Tamura.H, Preparation of Chitosan-Gelatin Based Sponge Cross-linked with GlcNAc for Bone Tissue Engineering, J Chitin

- ④ Nishida.E, Miyaji.H, Umeda.J, Kondoh.K, Takita.H, Kanayama.I, Tanaka.S, Kato.A, Fugetsu.B, Akasaka.T, Kawanami.M, Biological response to nanostructure of carbon nanotube/titanium composite surfaces, Nano Biomedicine, 7:11-20, 2015, 査読有  
<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/nano>
- ⑤ Umeda.J, Fugetsu.B, Nishida.E, Miyaji.H, Kondoh.K, Friction behavior of network-structured CNT coating on pure titanium plate, Appl Surf Sci, 357:721-727, 2015, 査読有  
DOI:10.1016/j.apsusc.2015.09.063
- ⑥ Kato.A, Miyaji.H, Ishizuka.R, Tokunaga.K, Inoue.K, Kosen.Y, Yokoyama.H, Sugaya.T, Tanaka.S, Sakagami.R, Kawanami.M, Combination of root surface modification with BMP-2 and collagen hydrogel scaffold implantation for periodontal healing in beagle dogs, Open Dent J, 9:52-59, 2015, 査読有  
DOI:10.2174/1874210601509010052
- ⑦ Yoshida.T, Miyaji.H, Otani.K, Inoue.K, Nakane.K, Nishimura.H, Ibara.A, Shimada.A, Ogawa.K, Nishida.E, Sugaya.T, Sun.L, Fugetsu.B, Kawanami.M, Bone augmentation using a highly porous PLGA/ $\beta$ -TCP scaffold containing fibroblast growth factor-2, J Periodont Res, 50:265-273, 2015, 査読有, DOI: 10.1111/jre.12206
- ⑧ Kanayama.I, Miyaji.H, Takita.H, Nishida.E, Tsuji.M, Fugetsu.B, Sun.L, Inoue.K, Ibara.A, Akasaka.T, Sugaya.T, Kawanami.M, Comparative study of bioactivity of collagen scaffolds coated with graphene oxide and reduced graphene oxide, Int J Nanomedicine, 9: 3363-3373, 2014, 査読有  
<http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S62342>
- ⑨ Nishida.E, Miyaji.H, Takita.H, Kanayama.I, Tsuji.M, Akasaka.T, Sugaya.T, Sakagami.R, Kawanami.M, Graphene oxide coating facilitates the bioactivity of scaffold material for tissue engineering, Jpn J Appl Phys, 53:1-7, 2014, 査読有  
<http://dx.doi.org/10.7567/JJAP.53.06JD04>

[学会発表] (計 20 件)

- ① 宮治裕史, 古月文志, 加藤昭人, 小川幸佑, 村上秀輔, 西田絵利香, 宮田さほり, 川本康平, 滝田裕子, 岩永敏彦, 本郷裕

- 美, 網塚憲生, 川浪雅光, TCP ナノ粒子を用いた組織再生用ナノ材料の創製と応用, 第 15 回日本再生医療学会, 2016 年 3 月 17 日-2016 年 3 月 19 日, 大阪国際会議場 (大阪市)
- ② 西田絵利香, 宮治裕史, 梅田純子, 近藤勝義, 滝田裕子, 吉田 崇, 村上秀輔, 眞弓佳代子, 薮 佳奈子, 古月文志, 川浪雅光, チタンと生体界面間へのカーボンナノチューブによるナノ構造の応用, 第 15 回日本再生医療学会, 2016 年 3 月 17 日-2016 年 3 月 19 日, 大阪国際会議場 (大阪市)
- ③ 宮治裕史, 酸化グラフェンの医療応用—歯周病治療, 再生医療への展開—, 第 5 回酸化グラフェンシンポジウム, 2015 年 12 月 11 日-2015 年 12 月 12 日, 岡山大学 50 周年記念館 (岡山市)
- ④ 西田絵利香, 宮治裕史, 滝田裕子, 岩永敏彦, 加藤昭人, 川浪雅光, 組織再生用ナノ酸化グラフェンスキヤフオールドによる骨新生効果, 日本歯科保存学会 2015 年度秋季学術大会 (第 143 回), 2015 年 11 月 12 日-2015 年 11 月 13 日, 文京シビックホール (文京区)
- ⑤ 川本康平, 宮治裕史, 吉田 崇, 西田絵利香, 加藤昭人, 舘山彰人, 滝田裕子, 岩永敏彦, 川浪雅光, 酸化グラフェン配合スキヤフオールドによる骨増生促進効果, 第 37 回日本バイオマテリアル学会大会, 2015 年 11 月 9 日-2015 年 11 月 10 日, 京都テルサ (京都市)
- ⑥ 村上秀輔, 宮治裕史, 西田絵利香, 川本康平, 宮田さほり, 滝田裕子, 岩永敏彦, 古月文志, 川浪雅光, リン酸カルシウムナノ粒子含有量の違いがスキヤフオールドの特性に及ぼす効果, 第 37 回日本バイオマテリアル学会大会, 2015 年 11 月 9 日-2015 年 11 月 10 日, 京都テルサ (京都市)
- ⑦ Nishida. E., Miyaji. H., Umeda. J., Kondoh. K., Takita. H., Fugetsu. B., Tanaka. S., Kato. A., Akasaka. T., Kawanami. M., Biocompatibility of CNT-Ti composite surface with different nanomorphologies, 93rd General Session of the IADR, 2015. 3. 11-2015. 3. 14, Hynes Convention Center (Boston, USA)
- ⑧ Miyaji. H., Nishida. E., Umeda. J., Kondoh. K., Takita. H., Fugetsu. B., Tanaka. S., Kato. A., Akasaka. T., Kawanami. M., Bioactive titanium surface using carbon nanotube net film, Visual-JW 2014, 2014. 11. 26-2014. 11. 12, ホテル阪急エキスポパーク (大阪市)
- ⑨ 加藤昭人, 宮治裕史, 光銭裕太, 小川幸佑, 百瀬赳人, 西田絵利香, 村上秀輔, 井原朝子, 吉田 崇, 田中佐織, 川浪雅光, ナノ  $\beta$ -TCP/コラーゲンスキヤフオールドの抜歯窩治癒促進効果, 日本歯科保存学会 2014 年度春季学術大会 (第 140 回), 2014 年 6 月 19 日-2014 年 6 月 20 日, 滋賀県立芸術劇場びわ湖ホール (大津市)
- ⑩ 宮治裕史, 西田絵利香, 今村琢也, 長尾敬志, 田中佐織, 川浪雅光, コンポジットレジン表面へのマイクロ・ナノ 3 次元微細構造の付与, 日本歯科保存学会 2014 年度春季学術大会 (第 140 回), 日本歯科保存学会 2014 年度春季学術大会 (第 140 回), 2014 年 6 月 19 日-2014 年 6 月 20 日, 滋賀県立芸術劇場びわ湖ホール (大津市)
- ⑪ 小川幸佑, 宮治裕史, 加藤昭人, 光銭裕太, 百瀬赳人, 吉田 崇, 西田絵利香, 村上秀輔, 川浪雅光, ナノ  $\beta$ -TCP コーティングスキヤフオールドと FGF2 併用による歯周組織治癒, 第 57 回春季日本歯周病学会学術大会, 2014 年 5 月 23 日-2014 年 5 月 24 日長良川国際会議場 (岐阜市)
- ⑫ 今村琢也, 宮治裕史, 赤坂 司, 西田絵利香, 長尾敬志, 川浪雅光, マイクロ・ナノパターンを付与したコンポジットレジン上への細胞接着, 第 57 回春季日本歯周病学会学術大会, 2014 年 5 月 23 日-2014 年 5 月 24 日長良川国際会議場 (岐阜市)
- ⑬ 宮治裕史, 西田絵利香, 滝田裕子, 金山和泉, 辻妹井子, 川浪雅光, 酸化グラフェンコーティングした組織再生用スキヤフオールドの特性比較, 第 13 回日本再生医療学会総会, 2014 年 3 月 4 日-2014 年 3 月 6 日, 京都国際会議場 (京都市)
- ⑭ 西田絵利香, 宮治裕史, 滝田裕子, 梅田純子, 近藤勝義, 古月文志, 田中佐織, 加藤昭人, 金山和泉, 川浪雅光, チタン表面のカーボンナノチューブコーティングと生体適合性評価, 第 13 回日本再生医療学会総会, 2014 年 3 月 4 日-2014 年 3 月 6 日, 京都国際会議場 (京都市)
- ⑮ 村上秀輔, 宮治裕史, 西田絵利香, 滝田裕子, 吉田 崇, 古月文志, 川浪雅光, カーボンナノチューブとナノリン酸カルシウムによるスキヤフオールドコーティング, 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会, 2013 年 11 月 25 日-2013 年 11 月 26 日, タワーホール船堀 (江戸川区)
- ⑯ Nishida. E., Miyaji. H., Takita. H., Kanayama. I., Tsuji. M., Kawanami. M., Graphene oxide for tissue engineering application, 26th International Microprocesses and Nanotechnology Conference, 2013 年 11 月 5 日-2013 年 11 月 8 日, ロイトン札幌 (札幌市)
- ⑰ 宮治裕史, 西田絵利香, 村上秀輔, 川浪雅光, 異なる濃度のナノ  $\beta$ -TCP 分散液で

コーティングしたコーラゲンスキャフ  
ォールの特性評価, 日本歯科保存学会  
2013 年度春季学術大会 (第 138 回), 2013  
年 6 月 27 日-2013 年 6 月 28 日, 福岡国  
際会議場 (福岡市)

- ⑱ 金山和泉, 宮治裕史, 西田絵利香, 辻 妹  
井子, 井上加菜, 井原朝子, 川浪雅光,  
グラフェンおよび酸化グラフェンフィ  
ルムに対する生体反応, 日本歯科保存学  
会 2013 年度春季学術大会 (第 138 回),  
2013 年 6 月 27 日-2013 年 6 月 28 日, 福  
岡国際会議場 (福岡市)
- ⑲ 西田絵利香, 宮治裕史, 辻 妹井子, 田  
中佐織, 金山和泉, 川浪雅光, 酸化グラ  
フェンおよびグラフェンによる歯根象  
牙質コーティングとタンパク吸着性の  
評価, 第 56 回春季日本歯周病学会学術  
大会, 2013 年 5 月 31 日-2013 年 6 月 1  
日, タワーホール船堀 (文京区)
- ⑳ 小川幸佑, 宮治裕史, 加藤昭人, 光銭裕  
太, 吉田 崇, 百瀬起人, 西田絵利香,  
村上秀輔, 川浪雅光, ナノβ-TCP/コー  
ラゲンスキャフォールのイヌ歯周組  
織欠損モデルへの応用, 2013 年 5 月 31  
日-2013 年 6 月 1 日, タワーホール船堀  
(文京区)

〔図書〕 (計 3 件)

- ① 宮治裕史, 西田絵利香, 古月文志, (31  
名, 24 番目) シーエムシー出版, 再生医  
療用足場材料の開発と市場, 2016, 267  
(129-136)
- ② 宮治裕史, (64 名, 55 番目), シーエム  
シー出版, カーボンナノチューブ応用最  
前線, 2014, 414 (358-363)
- ③ Miyaji, H., (45 名, 29 番目),  
Quintessence Publishing Co, Inc.,  
Advances in Oral Tissue Engineering,  
2014, 72 (19-24)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

名称: 酸化グラフェンを用いた組織再生医療  
用品

発明者: 宮治裕史, 西田絵利香, 川浪雅光,  
新開妹井子, 三村邦年

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2015-37521

出願年月日: 2015 年 2 月 27 日

国内外の別: 国内

名称: 抗菌性歯科用コーティング組成物

発明者: 宮治裕史, 田中佐織, 川浪雅光, 新  
開妹井子, 三村邦年

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2014-206954

出願年月日: 2014 年 10 月 8 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ; 歯周病再生治療研究グループ  
[http://www.den.hokudai.ac.jp/hozon2/bio  
mate.html](http://www.den.hokudai.ac.jp/hozon2/bio<br/>mate.html)

アウトリーチ活動

- ① 宮治裕史, 西田絵利香, 村上秀輔, 宮田  
さほり, 川本康平, 平成 27 年度北大病  
院実験教室, 2015 年 9 月 27 日
- ② 宮治裕史, 大学出前授業, 歯科治療に理  
工学の技術を使う・医工連携, 2014 年 9  
月 3 日, 札幌大谷高校 (札幌)
- ③ 宮治裕史, 吉田 崇, 西田絵利香, 宮田  
さほり, 川本康平, 平成 26 年度北大病  
院実験教室, 2014 年 8 月 31 日
- ④ 宮治裕史, 大学出前授業, 歯の病気と再  
生治療の研究, 2013 年 9 月 2 日, 札幌大  
谷高校 (札幌市)
- ⑤ 宮治裕史, 田中佐織, 金山和泉, 吉田 崇,  
西田絵利香, 平成 25 年度北大病院実験  
教室, 2013 年 9 月 1 日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮治 裕史 (MIYAJI HIROFUMI)

北海道大学・北海道大学病院・講師

研究者番号: 50372256

(2) 研究分担者

田中 佐織 (TANAKA SAORI)

北海道大学・北海道大学病院・講師

研究者番号: 90344522

加藤 昭人 (KATO AKIHITO)

北海道大学・歯学研究科 (研究院)・助教

研究者番号: 40507571

(3) 連携研究者

古月 文志 (FUGETSU BUNSHI)

東京大学

・政策ビジョン研究センター・特任教授

研究者番号: 40281844

(4) 研究協力者

西田 絵利香 (NISHIDA ERIKA)

北海道大学・北海道大学病院・医員