

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05033

研究課題名(和文) ラジカル殺菌によるインプラント周囲炎治療法のPOC取得のための検証的臨床試験

研究課題名(英文) Establishment of peri-implantitis treatment based on radical disinfection technique

研究代表者

佐々木 啓一 (Sasaki, Keiichi)

東北大学・歯学研究科・教授

研究者番号：30178644

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、研究代表者らが開発してきた過酸化水素の光分解反応を応用したラジカル殺菌技術をインプラント周囲炎の治療で用いるためにin vivoおよびin vitro試験を実施した。in vivo試験では、イヌに埋入したインプラントで周囲炎を発症させラジカル殺菌処理を行った。しかしながら、対照群と比較して有意な骨の再生は認められなかった。そこで、in vitro試験で処理条件の詳細な検討を行ったところ、ラジカル殺菌技術によって細菌汚染されたチタン表面が清浄化され、骨芽細胞が増殖できる環境を構築できることが分かった。今後、in vivoで効果を得るためのさらなる条件探索が必要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this project, in vitro and in vivo tests were performed with an aim of application of radical disinfection technique to treatment for peri-implantitis. In vivo test, where peri-implantitis caused around implants installed in dogs were treated with radical disinfection technique. However, there was no significant difference between the test and control groups. Thus, to find more suitable treatment conditions, in vitro test was additionally performed. The results demonstrated that the radical disinfection technique could recondition the titanium surface that had been previously contaminated by bacteria for subsequent osteoblastic cells. Therefore, future study should focus more on the establishment of treatment condition that enables to acquire re-osseointegration around the implants suffering from peri-implantitis.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：水酸化ラジカル インプラント周囲炎 ラジカル殺菌

1. 研究開始当初の背景

歯科用インプラントによる治療の普及に伴って、インプラント周囲炎の罹患率も増加している。インプラント治療を受けた患者のうち11~47%が、5~10年でインプラント周囲炎に罹患することが報告されている¹⁾。インプラント周囲炎は細菌感染による炎症性病変であり、その治療は細菌除去を主目的として行われる。しかし歯周病治療と異なって治療後の予後は決して良好ではなく、適切な治療法の確立が急務である。

インプラント周囲炎治療の難しさは、インプラントの形状に依存するところが多い。つまり、インプラントはスクリュー型の形状を有し、表面はナノ~マイクロレベルの粗面を有しているため、機械的な細菌除去が非常に困難となる。

研究代表者らはこれまでに過酸化水素光分解殺菌法の研究開発を行ってきた^{2,3)}。過酸化水素に波長400 nm付近の光を照射すると、光分解反応が起こり、水酸化ラジカルが生成する。水酸化ラジカルは酸化力が高く、強い殺菌作用を発揮する。これまでに、水酸化ラジカルが、齶蝕や歯周炎の原因菌を含む種々の細菌に対して殺菌活性を有していることを報告してきた。さらに、本殺菌法で繰り返し処理を行っても細菌は耐性を獲得しないことを実証した。このラジカル殺菌法は、光のON/OFFによって殺菌作用の発現を局所的に制御できるため、歯周ポケットといった局所での殺菌治療に応用できる。こういったコンセプトに基づいて産学官連携事業として新規歯周病治療器の研究開発を行い、ラジカル殺菌歯周病治療器を完成させた。

安全性については、文献レビューを通して短時間の殺菌治療では変異原性や発がん性のリスクは極めて低いことを確認した。またハムスターの頬袋を被験部位とした口腔粘膜刺激性試験をGLP (Good Laboratory Practice) に準拠して実施し、刺激性は認められなかったという結果を得ている。これらの知見を基に、2012年に臨床研究 (First in man) を実施してヒトにおいても安全性に問題ないことを確認した。一方、効果効能については、2014年に実施した探索的臨床研究において、新規治療器による非外科的歯周治療によって有意な歯周ポケット深さ (PPD) の減少が得られることを実証した。

2. 研究の目的

これまでに産学官連携事業として行った研究開発において歯周病治療器の完成まで達成してきた。本治療器は歯周病以外の歯科治療にも応用できるため、本研究ではラジカル殺菌治療器の適応をインプラント周囲炎治療に拡大するために、非臨床試験によるPOC (Proof of Concept) の取得およびそれに基づく臨床研究における実証を目的とした。

3. 研究の方法

(1) イヌのインプラント周囲炎モデルを用いた有効性の検証試験

東北大学の動物実験専門委員会の承認 (2015 歯動-054) を得て実験を行った。

6頭のビーグル犬 (月齢20ヶ月) を実験に用いた。被験動物に塩酸メドミジン (0.1 mg/kg) ミダゾラム (0.3 mg/kg) を筋注して、全身麻酔をかけた。キシロカインによる局所麻酔を併用して両側下顎第二、第三、第四小臼歯を抜歯した。抜歯後、3ヶ月の治療期間を設定した。抜歯後は、術後感染を予防する目的で3日間ジスロマックを経口投与した。

抜歯窩の治療後に、上記と同様の方法で全身麻酔および局所麻酔を行い、歯科用インプラント (Straumann Bone Level; 直径3.3 mm、長さ8 mm) を片顎当たり3本埋入した (6本/頭×6頭=36本)。インプラント埋入は、通常法に従って、ラウンドバーを用いた埋入部位のマーキング、ツイストドリルを用いたインプラント床の形成、プレタッピング、インプラント埋入の順序で行った。埋入後、術後感染の予防目的でジスロマックを3日間経口投与し、オッセオインテグレーション獲得のため3ヶ月の治療期間を設けた。

実験的にインプラント周囲炎を発症させるために、コットンリガチャーをインプラント周囲ポケットに挿入した。リガチャーは2週間に1度の間隔で交換し、合計で22週間にわたってリガチャー留置を行った (図1)。



図1. 実験的インプラント周囲炎の状態

その後、リガチャーを除去し、急性炎症を招待させる目的で4週間の期間を開けてから治療を行った。治療群は次の4群とした; Group 1: 3%過酸化水素 + 波長365 nm LED照射 (放射照度: 1000 mW/cm²) (図2)、Group 2: 3%過酸化水素、Group 3: 波長365 nm LED照射、Group 4: 滅菌水。片顎ごと (3本のインプラント) に治療法を無作為に割り付けた。治療は、フラップを開けて、プラスチックキュレットで肉芽組織を除去し、その後樹脂製スケーラーチップを用いた超音波スケーリングと上記の治療を併用し、インプラント1本あたり5分間の治療を行った。治療後治療期間を12週間設定し、ペントバルビタールの過剰投与で被験動物を安楽死させて、下顎の生検を採取した。

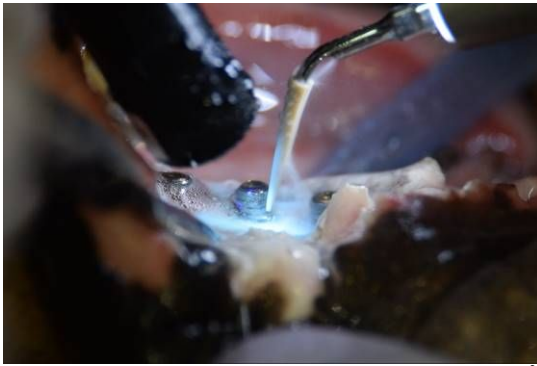


図 2 . 過酸化水素光分解殺菌法によるインプラント治療の様子

通法に従って、組織を固定した後、マイクロ X 線 CT 撮影を行った。その後、脱水、レジン包埋を行い、研磨切片を作製し、インプラント周囲の骨の状態を評価した。

(2)細菌で汚染されたチタン表面における骨芽細胞増殖比較試験

上記のイヌの実験で過酸化水素光分解殺菌法の有効性が認められなかったため、実験計画を変更して、臨床研究へは進まず治療・処理条件をより詳細に調べる目的で細胞試験を行った。

Grade 4 のチタンディスク (直径 5 mm, 厚さ 2 mm) をサンドブラストと 49%硫酸エッチングで処理し、Straumann インプラントと類似した表面性状 (SLA 表面) を付与した。

チタンディスクを 3%過酸化水素に浸漬し、365 nm LED 照射 (放射照度: 1000 mW/cm²) を 5 分間行った。その後、走査型電子顕微鏡 (JSM-7100F, JEOL)、非接触光干渉表面粗さ計 (TalySurf CCI HD-XL, Taylor Hobson)、原子間力顕微鏡 (SFT-3500, Shimadzu)、X 線回折分析装置 (SmartLab, Rigaku) を用いて、過酸化水素光分解殺菌法がチタン表面に及ぼす影響を分析した。

次に、インプラント周囲炎の発症に関与すると考えられている *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* JCM2434 の細菌懸濁液にチタン試料を浸漬し表面にバイオフィルムを形成させた。バイオフィルムを、樹脂製スケーラーチップを用いた 1 分間の超音波スケーリングで除去した。バイオフィルムを除去したチタン試料および追加で過酸化水素光分解殺菌法を用いて処理した試料の表面を、X 線光電子分析装置 (JPS-9010MC, JEOL) を用いて元素組成を分析した。

また、上記と同様に準備したチタン試料の表面上にマウス由来の骨芽細胞 (MC3T3-E1) を播種し、処理の違いによる細胞増殖の差を検討した。細胞増殖の程度は、MTT アッセイおよび共焦点レーザー顕微鏡を用いて評価した。

4 . 研究成果

(1)イヌのインプラント周囲炎モデルを用いた有効性の検証試験

リガチャー挿入によりインプラント周囲のポケット深さが増加し、プロービング時の出血が認められるようになった。デンタル X 線により骨喪失の状態を評価したところ、いずれのインプラントにおいてインプラント長の 1/3 ~ 1/2 の距離に相当する骨欠損が認められた。しかしながら、骨欠損の状態は想定していた垂直的骨欠損ではなく、水平的骨欠損であった (図 3)。

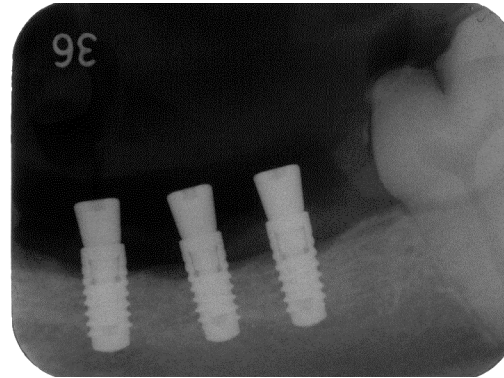


図 3 . リガチャー挿入で引き起こした実験的インプラント周囲炎による骨吸収の状態

マイクロ CT 分析の結果、インプラント周囲骨の状態について、群間で差は認められなかった (図 4)。

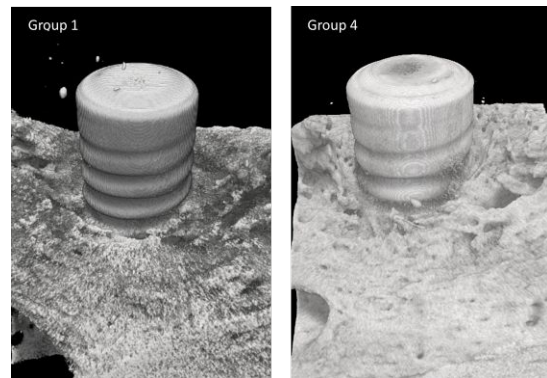


図 4 . マイクロ CT による治療後のインプラント周囲骨の状態の評価

また、組織学的分析においては、いずれの群においてもオッセオインテグレーションの再獲得を示す所見はほとんど認められなかった (図 5)。

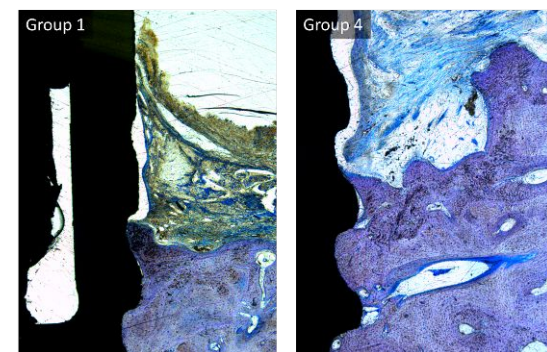


図 5 . インプラント周囲骨の組織像

本動物実験においては、過酸化水素光分解殺菌法の優越性を示すことができなかった。この原因としては、以下のことが考えられる；

垂直的骨欠損を引き起こす予定であったが、水平的骨欠損となってしまったため、治療後の骨の再生（再オッセオインテグレーションの獲得）につながらなかった。

インプラント1本あたり5分の治療時間としたが、頬側、舌側、近心、遠心面と4つの部位で考えた場合、1部位の治療時間は1分程度となるため過酸化水素光分解殺菌法による処理時間が短すぎた。

上記の実験結果を受け、予定していた臨床研究は実施せず、治療・処理条件をより詳細に検討するために細胞実験を行う計画に変更した。

(2)細菌で汚染されたチタン表面における骨芽細胞増殖比較試験

走査型電子顕微鏡、非接触光干渉表面粗さ計、原子間力顕微鏡による分析結果を図6に示す。

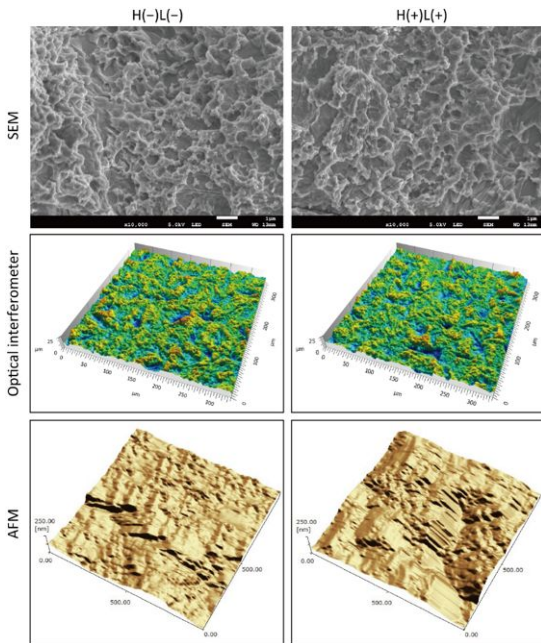


図6．チタン表面分析の結果

表面分析の結果、過酸化水素光分解殺菌法[H(+L(+))はチタン表面のマイクロレベルおよびナノレベルの物理的性状（表面粗さ）に影響を及ぼさないことを確認した。また、X線回折分析によって、表面の二酸化チタンの層も過酸化水素光分解殺菌法によって影響を受けないことが分かった。

X線光電子分析の結果、バイオフィームで汚染されたチタン表面は炭素の量が増加することが示された（図7）。過酸化水素光分解殺菌法で、追加で処理を行うと、バイオフィーム汚染によって増加した炭素が有意に減少することが分かった（図7）。

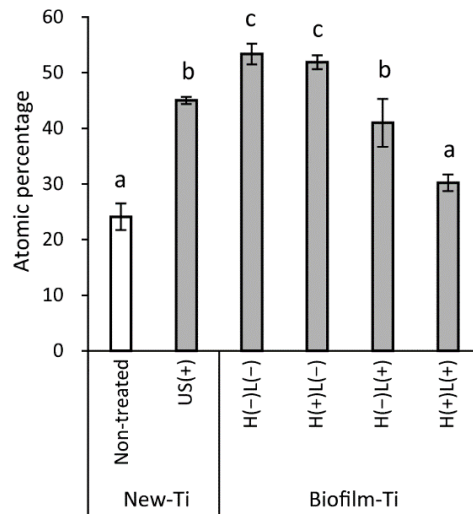


図7．チタン表面の炭素量

MTT アッセイおよび共焦点レーザー顕微鏡観察による細胞数カウントの結果を図8と9に示す。バイオフィーム汚染されたチタン表面であっても、過酸化水素光分解殺菌法[H(+L(+))で処理することで骨芽細胞が増殖できることが分かった。

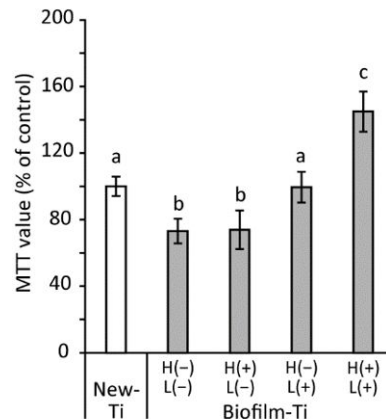


図8．MTT アッセイによる細胞増殖の評価

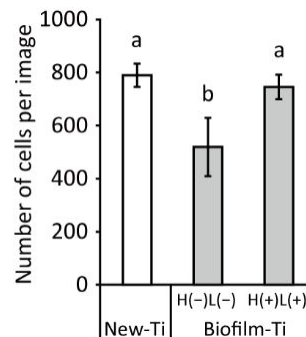


図9．顕微鏡観察による細胞数の評価

上記の in vitro 試験の結果は、過酸化水素光分解殺菌法は、バイオフィームに汚染されたチタン表面を清浄化し、骨芽細胞が増殖可能な環境を再び構築できることを示唆して

いる。従って、in vivo 試験で効果が認められなかった原因は、骨欠損の状態（水平的骨欠損）や部位当たりの処理時間が短かったことに起因するかもしれない。治療時間については、光源の出力を高めることで短縮することも可能であると考えられる。今後、本研究で得られた結果を基に、in vivo での効果を示すための研究を継続していく。

<引用文献>

1) American Academy of Periodontology report. J Periodontol, 84, 436-43, 2014.

2) Ikai H et al. Photolysis of hydrogen peroxide, an effective disinfection system via hydroxyl radical formation. Antimicrob Agents Chemother. 54, 5086-5091, 2010.

3) Odashima Y et al. Postantibiotic effect of disinfection treatment by photolysis of hydrogen peroxide. J Chemother, 26, 92-100, 2014.

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2件)

(1) Kanno T, Nakamura K, Ishiyama K, Yamada Y, Shirato M, Niwano Y, Kayaba C, Ikeda K, Takagi A, Yamaguchi T, Sasaki K.

Adjunctive antimicrobial chemotherapy based on hydrogen peroxide photolysis for non-surgical treatment of moderate to severe periodontitis: a randomized controlled trial. Sci Rep 7, 12247, 2017. doi:10.1038/s41598-017-12514-0 (査読有)

(2) Niwano Y, Konno K, Matayoshi T, Nakamura K, Kanno T, Sasaki K. Oral mucosal irritation study in hamster to evaluate a therapeutic apparatus using hydrogen peroxide photolysis for periodontitis treatment. Regul Toxicol Pharmacol, 90, 206-213, 2017. doi: 10.1016/j.yrtph.2017.09.019 (査読有)

〔学会発表〕(計3件)

(1) Nakamura K, Shirato M, Tenkumo T, Kanno T, Westerlund A, Örtengren U, Sasaki K, Niwano Y. Reconditioning of biofilm-contaminated titanium surface for osteoblast proliferation by hydroxyl radicals generated via H₂O₂ photolysis. International Symposium for Multimodal Research and Education in IOHS-Liaison 2018

(2) Tenkumo T, Saenz JRV, Nakamura K,

Shimizu Y, Sokolova V, Epple M, Kamano Y, Egusa H, Sugaya T, Sasaki K. Gene Transfection In Vivo with Bone Morphogenetic Protein-2 encoding DNA-Functionalized Calcium Phosphate Nanoparticle-Loaded Collagen Scaffolds. International Symposium for Multimodal Research and Education in IOHS-Liaison 2018

(3) Shirato M, Keisuke N, Kanno T, Lingström P, Niwano Y, Örtengren U. Comparison of antimicrobial activity of hydrogen peroxide photolysis against Streptococcus mutans biofilm with photodynamic therapy. CED-IADR 2017

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐々木 啓一 (SASAKI, Keiichi)
東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：30178644

(2)研究分担者

庭野 吉己 (NIWANO, Yoshimi)
東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：40375184

菅野 太郎 (KANNO, Taro)
東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：30302160

天雲 太一 (TENKUMO, Taichi)
東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：80451425

中村 圭祐 (NAKAMURA, Keisuke)
東北大学・大学院歯学研究科・講師
研究者番号：30431589