

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11211

研究課題名(和文) 強固な上皮付着と抗菌性を有する表面改質歯科用インプラントの開発

研究課題名(英文) Development of the surface-improved dental implant with strong epithelial adhesion and antibacterial properties

研究代表者

中石 典子(寺田) (NAKAISHI, Michiko)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・技術職員

研究者番号：60374550

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：リン酸を鎖状に結合した高分子物質のポリリン酸をハイドロキシアパタイト(HA)にコートさせ、抗菌性を有したポリリン酸コートHA歯科用インプラントの創製を目的に、本研究では歯周病菌の一種であるStreptococcus gordoniiに対するポリリン酸およびポリリン酸コートHAの抗菌性を検討した。平均鎖長100の長鎖ポリリン酸が最も抗菌効果があり、その最小発育阻止濃度は0.2wt%であった。また、この条件でポリリン酸をコートしたHAに高い抗菌効果を認めた。

研究成果の概要(英文)：Inorganic polyphosphate (Poly P) is a polymeric substance and is elaborated by chained phosphate. We aimed to create the hydroxyapatite(HA) dental implant coated with Poly P having antibacterial effect. Therefore, we examined the antibacterial effect of Poly P and HA coated with Poly P against Streptococcus gordonii that is a kind of periodontopathic bacterium. The averaged out chain length of 100 regarding a long chain Poly P had the most antibacterial effect and the minimum inhibitory concentration was 0.2wt%. HA coated 0.2wt% with an averaged out length of 100 concerning a long chain Poly P had a high antibacterial effect against Streptococcus gordonii.

研究分野：歯科医用工学

キーワード：ポリリン酸 ハイドロキシアパタイト(HA) Streptococcus gordonii 抗菌性

1. 研究開始当初の背景

インプラント周囲歯肉上皮は、天然歯のように基底膜を持ちヘミデスマソームも存在するものの、天然歯と比較しその絶対数が少く、インプラント体と周囲歯肉上皮の接着、封鎖強度は低い。また、インプラント埋入による上皮組織の連続性断裂が上皮組織機構に不均衡をもたらし、外来刺激に対し過剰反応を起こすことにより、上皮細胞がインプラント体に沿って深部へ増殖侵入していくと考えられている。そして、口腔内は常に歯周病菌に曝されているという特異な環境であるため、何かしらの対処をしない限り歯周病に罹患する可能性が高い。インプラント埋入後、インプラント周囲組織に炎症が波及すると、前述の由より周囲組織の破壊は急激に著しい機転を来し、時としてインプラント脱落・抜去など予後不良となる。そのため、インプラントと歯肉の接着を向上させることが試みられているものの、インプラント周囲炎の波及を阻止しきれない。

歯周病菌の代表的かつ重要視されているグラム陰性桿菌である *Porphyromonas gingivalis* は、単独では歯面に付着することができず歯周組織に為害性を示さない。しかし、歯面に初期に付着するグラム陽性通性嫌気性菌の *Streptococcus gordonii* (*S. gordonii*) などの初期定着細菌群と、歯面に付着できない他の細菌と共凝集することで歯周組織を破壊していく。このことから *S. gordonii* を歯面から排除することで歯周組織の破壊の波及を抑えることができるのではないかと推測した。そこで、日本において多用されているインプラント体が骨に結合するオステオインテグレーションを優位に誘引しながらも、上皮接着が認められるハイドロキシアパタイト (HA) コートチタン (Ti) インプラントと、あらゆる生物内に元来存在するリン酸が鎖状に結合した高分子物質のポリリン酸 ($(\text{PnO}_{3n+1})_{(n+2)-}$) の抗菌作用に着目した。抗菌性を示すポリリン酸を HA コート Ti インプラントにコートさせることで、初期接着細菌であり、他の細菌と共凝集する *S. gordonii* の侵襲を低減させ、インプラント周囲組織の破壊を抑制できるのではないかと考えた。しかしながら、ポリリン酸の抗菌性の報告はあるものの、各細菌への効果や影響の報告は少なく、*S. gordonii* においては確認できない程であった。

このことから、本研究では HA にポリリン酸をコートさせるだけでなく、ポリリン酸と *S. gordonii* に対する抗菌性とその影響について検討することとした。

2. 研究の目的

HA コーティング Ti インプラントにポリリン酸がコートされた抗菌性を有す機能性歯科用 Ti インプラントの創製を本研究の目的とした。

本研究は、上記目的遂行のため以下の点を

具体的な研究目標とした。

(1) ポリリン酸ナトリウム(以下、ポリリン酸と呼称す)は、鎖長の違いにより短鎖(鎖長 7-12)、中鎖(平均鎖長約 60)、長鎖(平均鎖長約 130)に分類できる。これら鎖長の違いや濃度の違いにより *S. gordonii* の発育抑制に有効な条件を明らかにする。

(2) HA disc をポリリン酸水溶液へ浸漬し、ポリリン酸の HA へのコートの可否を表面観察、元素分析から判ずる。

(3) ポリリン酸による *S. gordonii* への影響、及び HA disc 上の *S. gordonii* への影響を形態学的、生化学的に検討する。

3. 研究の方法

(1) ポリリン酸の増殖発育抑制に有効な条件の検討

微量液体希釈法に則り、長、中、短鎖のポリリン酸を培地で段階希釈し、*S. gordonii* を接種、嫌気培養を行い、細菌の増殖抑制に有効なポリリン酸の最適鎖長、細菌発育抑制に有効なポリリン酸の最適最小発育阻止濃度 (MIC) を検討した。

(2) HA disc へのポリリン酸コートの可否
平均鎖長 100 の長鎖ポリリン酸水溶液 (以降、lp(100)と呼称す。) に HA Disc (3D Biotek, LLC) を 24 時間浸漬後、37 °C にて 10 日間乾燥させた (以降この処理を行った HA Disc を、lp(100)HA と呼称す。)

0.05wt% トルイジンブルー染色溶液に lp(100)HA を真空の状態にて浸透させ、洗浄、乾燥後、染色された lp(100)HA 表面と、物理的に割断した割断面を観察した。

lp(100)HA 表面をエネルギー分散型 X 線分光器 (EDS, S-4500/EMAX-7000, Hitachi) を用いて元素分析を行った。

(3) ポリリン酸による細菌への影響

lp(100) が 0.2wt% となるよう調整した培地 (以降、0.2%lp(100)培地と呼称す。) に *S. gordonii* (1×10^5 CFU/well) を接種し、() 通常培地にて 24 時間培養 () 0.2%lp(100)培地にて 24 時間培養 () 通常培地にて 24 時間培養後、培地を除去し 0.2%lp(100)水溶液を 30 秒間暴露、という 3 条件の培養・処置を行った。この培養・処置後、蛍光染色を行い、抗菌効果を生菌と死菌の領域から半定量的に判定した。さらに、走査型電子顕微鏡 (SEM, S-4500/EMAX7000, Hitachi) にてポリリン酸による細菌への影響を形態学的に検討した。

0.2%lp(100)培地に *S. gordonii* (1×10^5 CFU/well) を接種し、0-60 秒間ポリリン酸を暴露させた。暴露後、グルタルアルデヒド固定、ネガティブ染色を行い、透過型電子顕微鏡 (TEM, H-7100/XR81, Hitachi) にてポリリン酸の *S. gordonii* への影響を形態学的に検討した。

4. 研究成果

(1) 48 時間培養では *S. gordonii* の増殖抑

制は長鎖と中鎖が短鎖より効果があったが、120 時間培養になると長鎖が最も効果が高かった (図 1)。また、長鎖ポリリン酸のうち平均鎖長 100 の方が平均鎖長 130 より細菌の増殖抑制に効果があった (図 2)。このことより平均鎖長 100 の長鎖ポリリン酸が最も *S. gordonii* の増殖を抑制する効果があり、その最小発育阻止濃度 (MIC) は 0.2wt% であることが分かった (図 2)。

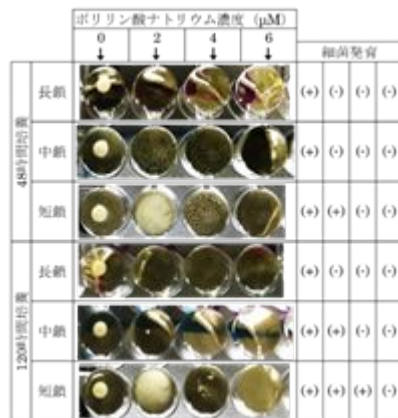


図 1 ポリリン酸の鎖長の違いによる *S. gordonii* の発育抑制

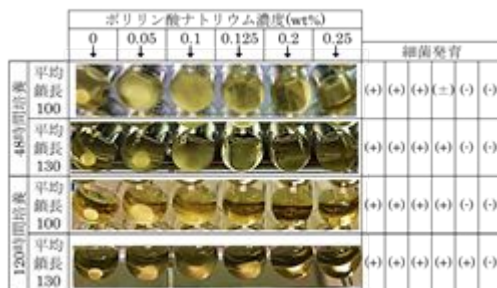


図 2 長鎖ポリリン酸の鎖長の違い及び濃度の違いによる *S. gordonii* の発育抑制

(2) lp(100)HA 表面は、トルイジンブルーにより紫～青紫に染色され、ポリリン酸を浸透させた濃度に依存し濃染されていった。また、HA 内部へも濃度依存的な染色が認められた。元素分析においては、lp(100)HA 表面にポリリン酸の存在を示すナトリウムを認めた。これらのことから、HA Disc にポリリン酸をコートすることが可能であることが分かった (図 3)。

	0%lp(100)HA	0.25%lp(100)HA	0.1%lp(100)HA
トルイジンブルー染色 HA Disc (厚さ=5μm)	外観 断面	外観 断面	外観 断面
lp HA 表面 元素分析 (Atomic%)	Na P Ca Total	0.00 44.04 55.96 100.00	0.33 43.82 55.85 100.00
		2.98 45.42 51.6 100	

図 3 トルイジンブルー染色された lp(100)HA 外観と断面 および lp(100)HA 表面の元素分析結果

(3) 作製した 0.2%lp(100)HA に *S. gordonii* を接種し蛍光染色を行ったところ、0.2wt%lp(100)HA を用いた培養では対照と

なる 0%lp(100)HA を用いた場合よりも細菌の発育を抑制した。また、0.2%lp(100)水溶液を 30 秒間暴露することで細菌の発育を有意に抑制した。(図 4 及びグラフ 1)。

SEM 像から、0.2%lp(100)HA 上の細菌数は、0%lp(100)HA よりも少なく、細菌の連鎖も短くなっていたことが分かった。0.2%lp(100)培地にて培養したところ、HA 上に細胞をほとんど認めなかった。また、ポリリン酸を暴露させた場合、細菌の破裂像が多く認められた (図 5)。TEM 像においても、ポリリン酸を暴露された細菌は、その形態の破壊されることがわかったが認められ、暴露時間が長いほど細菌塊は小塊になっていた (図 6)。

以上より、ポリリン酸により *S. gordonii* の形態は破壊され、細菌の発育抑制や細胞死を引き起こすと考えられた。

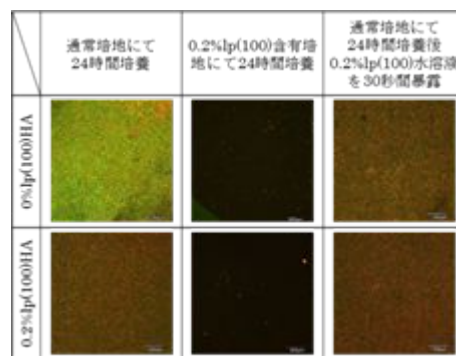
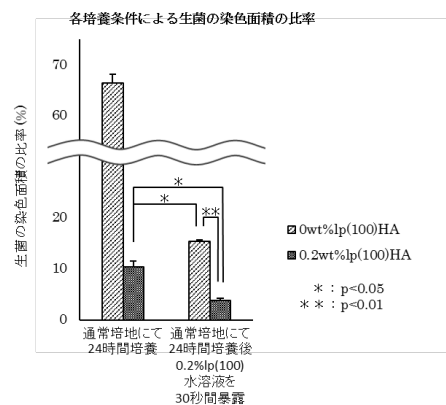


図 4 各条件で培養された 0.2%lp(100)HA 上の *S. gordonii* の蛍光染色像 (緑色: 生菌, 赤色: 死菌, 黒色: HA disk 表面)



グラフ 1 各培養条件による生菌の染色面積の比率 (蛍光染色画像から無作為に 5 箇所を抽出。各々の全画像に占める緑色に染色された領域 (生菌) の割合を算出した。検定は Tukey 法を用いた。)

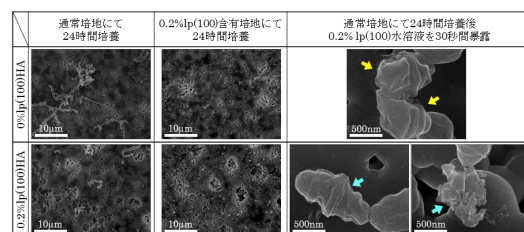


図 5 各条件で培養された 0.2%lp(100)HA 上の *S. gordonii* の SEM 像 (矢印: 細菌の形態破壊)

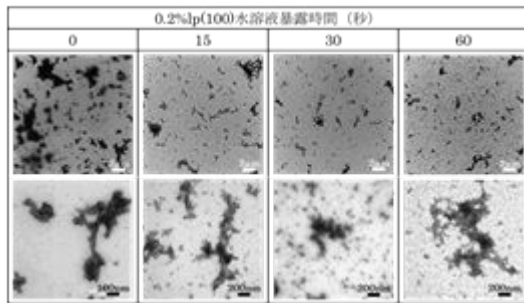


図6 ポリリン酸を暴露された *S. gordonii* の経時的変化を示す TEM 像

本研究から、0.2%lp(100)HA および 0.2%lp(100)水溶液には初期定着細菌である *S. gordonii* に対し抗菌効果があることが分かった。今回行った研究では、時間的猶予がなかったため調べることが出来なかったが、引続き上皮細胞に対する親和性を lp(100)HA を用いた 2 次元培養だけでなく 3 次元培養も行い、lp(100)HA との相関について調べたいと考えている。

5. 主な発表論文等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中石 典子 (NAKAISHI, Michiko)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究

所・技術職員

研究者番号：60374550