

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06604

研究課題名(和文) Ag/ナノカーボンを用いた抗菌性スキャフォールドの開発と歯周組織再生効果

研究課題名(英文) Evaluation of regeneration of periodontal tissue of antibacterial scaffold using Ag/nanocarbon and

研究代表者

西田 絵利香(Nishida, Erika)

北海道大学・大学病院・医員

研究者番号：50779882

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではAg担持型ナノカーボンスキャフォールドを創製し、歯周組織再生効果を実証することを目的とした。GO, Ag/GOスキャフォールドに細胞毒性は認められず、細菌培養試験ではAg/GOスキャフォールドで細菌増殖抑制効果を認めた。また、ラットでの組織学的観察ではコラーゲンスキャフォールドと比較して、GO, Ag/GOスキャフォールドは生体親和性は良好であった。イヌの抜歯窩埋入実験では、GO, Ag/GOスキャフォールドで骨再生に大きな差を認めなかった。以上よりGOコーティングはスキャフォールドの特性を向上させ、Ag/GOスキャフォールドは抗菌性を発揮できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to demonstrate the periodontal regeneration effect by creating Ag supported nanocarbon scaffold. No cytotoxicity was observed in GO and Ag/GO scaffolds, and bacterial growth inhibitory effect was observed in Ag/GO scaffold in bacterial culture test. In the histological observation in rats, the biocompatibility of GO and Ag/GO scaffolds was better than that of collagen scaffolds. In dog extraction tooth extraction, there was no significant difference in bone regeneration at GO, Ag/GO scaffold. From the above, it was suggested that the GO coating improves the properties of the scaffold and that the Ag/GO scaffold could exhibit antibacterial properties.

研究分野：歯周組織再生

キーワード：歯周組織再生 スキャフォールド ナノカーボン 酸化グラフェン 抗菌性 Ag

1. 研究開始当初の背景

歯周病は生活習慣病の一つで、超高齢社会を迎え増加の一途をたどっている。現在、骨移植やGTR法、エムドゲインを用いた歯周組織再生療法が臨床応用されているが、重度歯周病では十分な再生効果が得られていない。近年ティッシュエンジニアリングの概念に基づいて、歯周組織再生療法に細胞や増殖因子を組み合わせた足場材(スキャフォールド)使用の重要性が認識されている。

しかし口腔内には細菌が大量に存在しており、歯周組織欠損部は表在性で易感染性部位のため、スキャフォールドの露出に伴うプラーク感染が引き起こされやすく、再生療法が失敗に終わるケースが後を絶たない。

したがってスキャフォールド自体が生体親和性ととも抗菌性を有し、重篤な感染を防ぐことが可能であれば歯周組織再生に有効であると考えられるが、このような高い能力を発揮するスキャフォールドはいまだ無く、新規開発の必要性があると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では Ag 担持型ナノカーボンを用いて抗菌性スキャフォールドを開発し、歯周組織再生効果を実証することを目的とする。口腔内で使用される歯周組織再生用足場材(スキャフォールド)には適切な抗菌性が求められる。申請者は近年ナノカーボン材料である炭素の単層シート、すなわち酸化グラフェン(GO)を用いたスキャフォールドを作製し、バイオアクティブ活性や抗菌効果を明らかにした。しかしGOスキャフォールドの抗菌性は十分ではなかった。

そこでGOスキャフォールドに優れた抗菌性を発揮する銀(Ag)を担持させた高機能GOスキャフォールドを創製し、抗菌評価、生物学的スクリーニング評価、および歯周組織再生効果を検討する。さらにこのスキャフォールドに生理活性物質(増殖因子等)の担持を行って再生量の増大を図る。

3. 研究の方法

本研究計画では、銀(Ag)を担持させた歯周組織再生に最適化した酸化グラフェン(GO)スキャフォールドを作製、歯周再生治療へ展開することが目的である。

(1) 担持させる Ag や生理活性物質の条件設定、細菌を用いた抗菌性試験、培養細胞を用いた生体親和性試験、バイオアクティブ効果に関する生化学的分析を行う。

(2) ラット皮下ならびに頭蓋骨欠損モデルへ移植して生体内での組織反応、骨形成効果を検討する。

(3) 前臨床試験としてイヌ歯周病モデルを用いてスキャフォールドの移植実験を行い、臨床データ取得を行い、組織学的に歯周組織再生効果を検討する。

平成 28 年度

GO スキャフォールドの作製と Ag の担持

タイプIコラーゲンによるコラーゲンスポンジをGO分散液に浸漬、エタノール系列にて洗浄、乾燥させてGOスキャフォールドを作製する。また硝酸銀を添加してAgを担持させたGOを用いて同様にスキャフォールドを作製する。GOならびにAg-GOは(株)日本触媒、コラーゲンスポンジはオリンパステルモバイオマテリアル(株)より試料提供、技術供与を受ける。

スキャフォールドの微細構造評価

SEMにて表面、断面の形態、連通孔の様子を観察する。

抗菌性試験

口腔内細菌である *S mutans* (ATCC 35668) を用いて各スキャフォールドの抗菌性について評価する。

培養細胞試験

細胞には理研バイオソースセンターから提供を受けた骨芽細胞 MC3T3-E1 を用いる。SEMにてスキャフォールド上の細胞の附着状態、形態、伸展の様子を観察する。免疫染色によるアクチンマイクロフィラメント染色による形態観察も同時に行う。特に複合化物質が細胞接着に与える影響を、アダプタータンパクの vinculin の発現を免疫染色にて同定する。また LIVE/DEAD, CCK-8, LDH アッセイによる細胞親和性試験を行う。

～ の結果を分析して、ラット移植試験のための Ag イオン、ならびに生理活性物質の種類、濃度に関して最適条件を絞り込み、以下実験に使用する。

ラット移植試験

動物実験は「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程」に従って行う。ラットに全身麻酔および局所麻酔を施し、背部皮下に各スキャフォールドを移植する。HE染色を行い、スキャフォールドの面積を計測することで生体吸収量を同定する。

これらの結果から歯周組織再生のために最適な条件を決定して、以下イヌ歯周病モデルでの検討を行う。

平成 29 年度 イヌにおける再生試験

実験的歯周炎モデルの作製

動物実験は「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程」に従って行う。全身および局所麻酔下にてビーグル犬の前臼歯部を除去し、GO、GO/Ag スキャフォールドを埋入した。術後4週後に安楽死処置後、脱灰薄切標本を作製する。

X線写真撮影ならびにマイクロCT撮影を行い、骨再生程度を評価する。

4. 研究成果

本研究では Ag 担持型ナノカーボンスキャフォールドを創製し、歯周組織再生効果を実証することを目的とした。ナノカーボンとして再生医療分野での開発が期待されている酸化グラフェン(GO)を使用した Ag 担持型酸化グラフェン(提供;日本触媒)を用いて、

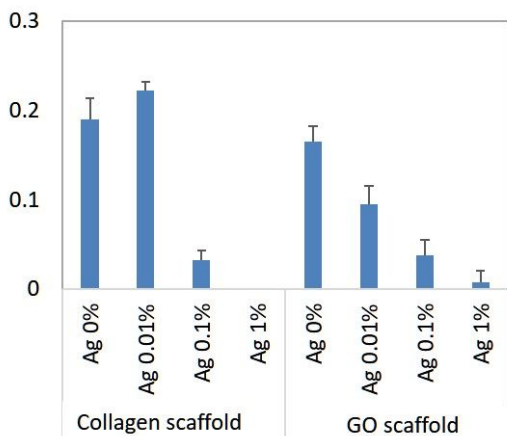


図2 細菌培養試験 (濁度)

SEM 観察の結果、スキャフォールドは一樣にGO フィルムに覆われ、コーティング後もスキャフォールドは内部空間を維持していた。圧縮強度測定ではGO、Ag/GO スキャフォールドで向上した。細胞増殖量はGO、Ag/GO コーティング群でもコントロールと同程度であったが (図1)、細菌培養試験ではAg/GO スキャフォールドで細菌増殖抑制効果を認めた (図2)。

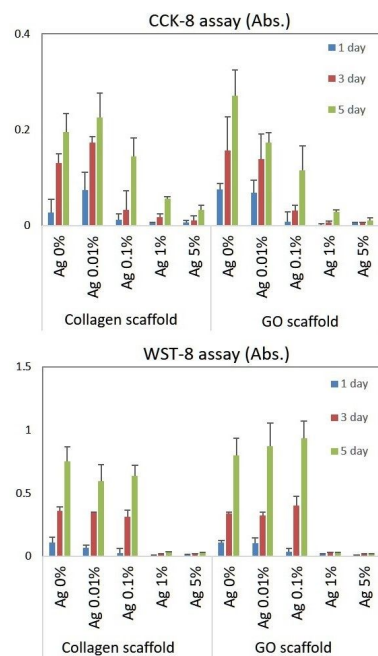


図1

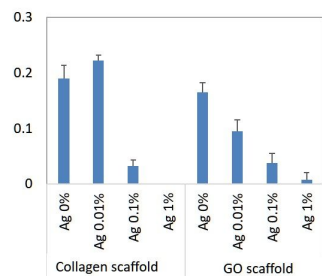


図2 細菌培養試験 (濁度)

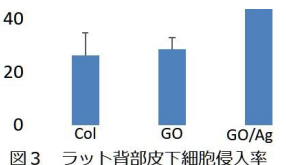


図3 ラット背部皮下細胞侵入率

また、ラットでの組織学的観察でコラーゲンスキャフォールドに比較して、GO 群はスキャフォールド周囲での炎症性細胞の浸潤も認めず、スキャフォールド内部への良好なイングロースを観察した。よってGO、Ag/GO スキャフォールドの生体親和性は良好であった (図3)。

ビーグル犬の抜歯窩埋入実験では、GO、Ag/GO スキャフォールドで骨再生に大きな差を認めなかった。

以上よりGO コーティングはスキャフォールドの特性を向上させ、Ag/GO スキャフォー

ルドは抗菌性を発揮できる可能性が示唆された。

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6件)

K Nagao, H Miyaji, E Nishida, T Akasaka, S Miyata, K Shitomi, K Mayumi, A Kato, T Sugaya. Near-infrared irradiation and graphene oxide film fabricated on dentin surface exhibit photothermal and antibacterial effects. *Journal of Oral Hygiene and Health*, 6, 2018, 1-6. 査読有. DOI: 10.4172/2332-0702.1000231

A Tateyema, A Kato, H Miyaji, E Nishida, Y Iwasaki, S Fujii, K Kawamoto, K Shitomi, T Furihata, K Mayumi, T Sugaya. Bone Induction by α -tricalcium Phosphate Microparticle Emulsion Containing Simvastatin. *Nano Biomedicine*, 9, 2017, 69-76. 査読有.

S Miyata, H Miyaji, H Kawasaki, E Nishida, K Shitomi, T Akasaka, S Tanaka, T Iizuka, T Sugaya. Antibacterial and cytotoxic effects of photoexcited Au clusters via blue high-power or white low-power light emitting diode irradiation. *Biology, Engineering and Medicine*, 2, 2017, 1-4. 査読有. doi: 10.15761/BEM.1000126

A. J. Nathanael, A Oyane, M Nakamura, I Sakamaki, E Nishida, Y Kanemoto, H Miyaji. In Vitro and in Vivo Analysis of Mineralized Collagen-Based Sponges Prepared by a Plasma- and Precursor-Assisted Biomimetic Process. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 9, 2017, 22185-22195. 査読有. DOI: 10.1021/acsami.7b04776

S Miyata, H Miyaji, H Kawasaki, M Yamamoto, E Nishida, H Takita, T Akasaka, N Ushijima, T Iwanaga, T Sugaya. Antimicrobial photodynamic activity and cytocompatibility of Au₂₅(Capt)₁₈ clusters photoexcited by blue LED light irradiation. *International Journal Nanomedicine*, 12, 2017, 2703-2716. 査読有. <http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S131602>

S Murakami, H Miyaji, E Nishida, K

Kawamoto, S Miyata, H Takita, T Akasaka, B Fugetsu, T Iwanaga, H Hongo, N Amizuka, T Sugaya, M Kawanami. Dose effects of beta-tricalcium phosphate nanoparticles on biocompatibility and bone conductive ability of three-dimensional collagen scaffolds. Dental Materials Journal, 36, 2017, 573-583. 査読有.
doi:10.4012/dmj.2016-295

〔学会発表〕(計3件)

A.J. Nathanael, A Oyane¹, M Nakamura, H Miyaji, E Nishida. Apatite-coated collagen sponges for tissue engineering applications. IUMRS-ICAM 2017-The 15th International Conference on Advanced Materials, Aug 27-Sep 1, 2017 (京都府京都市).

西田絵利香, 宮治裕史, 部佳奈子, 菅谷 勉.
Zinc-Fluoride ガラス塗布材のイオン徐放性と抗菌効果. 第147回日本歯科保存学会2017年度秋季学術大会, 2017年10月26-27日(岩手県盛岡市).

田中佐織, 宮治裕史, 西田絵利香, A. Joseph NATHANAEL, 中村真紀, 大矢根綾子, 田中 享, 飯田俊二, 高師則行, 井上 哲. レーザー援用バイオメテック法によるレジン表面の改変とアパタイト形成能評価. 第10回日本総合歯科学会, 2017年11月3-5日(新潟県新潟市).

〔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〕

歯周病再生治療研究グループ

<http://www.den.hokudai.ac.jp/hozon2/tissue-engineering.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西田絵利香 (NISHIDA, Erika)

北海道大学・大学病院

医員

研究者番号: 50779882

(2) 研究分担者

なし