

令和元年6月20日現在

機関番号：32703

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15814

研究課題名(和文) 抗酸化型ナノレドックス粒子による新たなインプラント周囲炎治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new treatment for peri-implantitis with antioxidative nanoredox particles

研究代表者

木本 克彦 (Katsuhiko, Kimoto)

神奈川県立大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：70205011

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ラットインプラント周囲炎モデルを用いてナノレドックス粒子(RIG)の抗酸化作用について検討した。In Vivo の評価ではインプラント体周囲骨の評価を行い、RIGによる骨量の維持が確認された。また、組織内における酸化の定量を行い、RIGの抗酸化作用を確認した。In Vitro の評価では、RIGによる骨芽様細胞の接着・増殖能ならびに分化能の効用が示された。さらに、インプラント周囲炎モデルに対するRIGによる抗酸化作用のメカニズムについても評価検討を行った。本研究課題において、インプラント周囲炎モデルに対するRIGの抗酸化効果が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、インプラント周囲炎の発症率が増加している。本研究は、インプラント周囲炎に対し、ナノレドックス粒子(レドックスインジェクタブルゲル：RIG)による抗酸化という新たな視点による治療法を開発することを目的とした。本実験において、インプラント周囲炎モデルに対するRIGの抗酸化効果が確認された。本研究が新規治療法の基盤となれば、予防的治療法の一環として、社会的貢献度は極めて高いと言える。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the present study was to evaluate the antioxidant effects of nanoredox particles (redox injectable gel: RIG) on peri-implantitis.

The antioxidant effects of RIG were examined using a rat peri-implantitis model. During in vivo evaluation, bone surrounding the implant was evaluated, and maintenance of bone mass due to RIG was confirmed. In addition, quantification of oxidation in tissues was performed, and the antioxidant effects of RIG were confirmed. In vitro assessment demonstrated the ability of RIG to attachment to and proliferation as well as differentiation ability of osteoblast-like cells. Furthermore, the underlying mechanism of the antioxidant effects of RIG on the peri-implantitis model was also evaluated. In the present study, the antioxidant effects of RIG on the peri-implantitis model were confirmed.

研究分野：補綴・インプラント学

キーワード：インプラント周囲炎 ナノレドックス 抗酸化作用 活性酸素

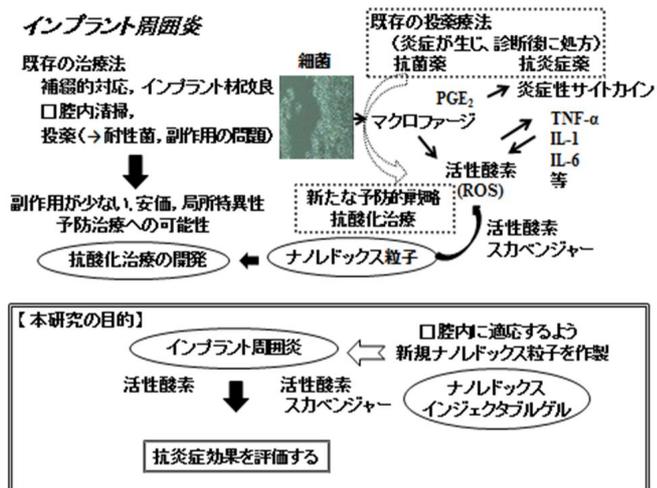
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

インプラント周囲炎の発症率は、28~56% と高く、インプラント治療の適応症が拡大するに伴い、今後さらに発症率が増加することが予想される。既存の薬物療法は、宿主の免疫力と細菌の病原性のバランスが崩れて炎症が発症した後に抗菌薬と抗炎症薬が処方される。本研究は、炎症やウィルスの防御、アポトーシス等に対して有用な機能を果たしている活性酸素種 (Reactive oxygen species (ROS)) に着目し、抗酸化剤であるナノドックス粒子 (redox injectable gel (RIG)) の臨床応用を行っている。RIG は、疾患部位に対して特異的に作用し正常なミトコンドリア電子伝達系を破壊しない為、副作用が少ないという特徴から創薬としての活躍が期待されている。生体内で過剰に発生している ROS を消去する薬剤は既に医科の臨床の場で活躍しており、潰瘍性大腸炎等のモデルに対し、有用な効果を示すことが近年報告されている。我々はこれまで ROS との関連が報告されている歯槽骨吸収モデルにおける RIG の骨吸収抑制効果を報告してきた (Saita *et al*, 2016, Biomaterials) <sup>1)</sup>。

2. 研究の目的

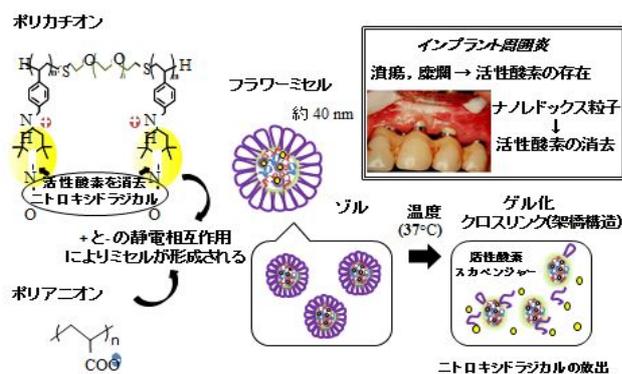
本研究は近年 ROS との関連が報告されているインプラント周囲炎 (右図) に対し RIG の効用を評価することを目的とし、骨芽様細胞への影響およびインプラント周囲炎モデルに対する RIG の抗炎症作用を明らかにする。



3. 研究の方法

実験 1) 口腔内に適応させた新規 RIG の作製方法

口腔内特有の環境下 (唾液流動性、細菌叢の存在) を考慮したうえ、右記の方法を応用し口腔内に適応させた新規 RIG の作製を行った (右図)。

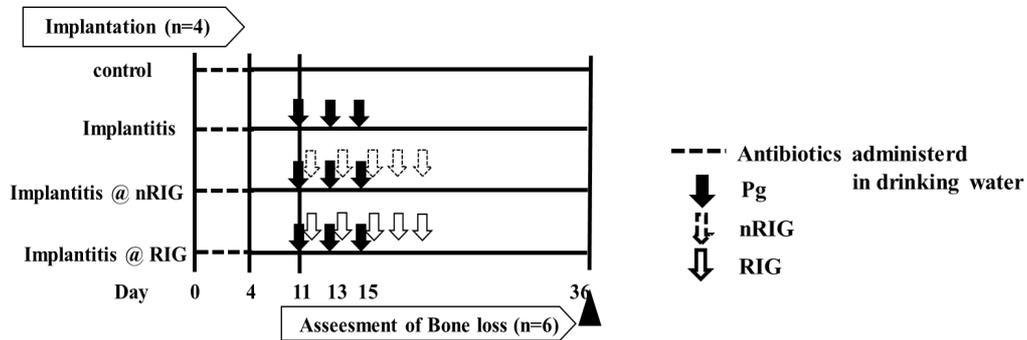


実験 2) 疑似的な酸化条件下における骨芽様細胞の RIG に対する挙動評価

8 週齢の雄 Sprague-Dawley ラットの骨髄より採取した骨芽様細胞を培養し、過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) による酸化状態を再現した <sup>2)</sup>。そして、RIG の抗酸化能による細胞接着能・増殖能 (Cell proliferation assay; WST-1, Cell count), ならびに分化能 (アルカリフォスファターゼ活性・染色, Von kossa 染色) の変化を調べた。

実験 3) インプラント周囲炎モデルに対する RIG の抗炎症作用

インプラント周囲炎モデルを作製した 5 週齢の雄性 Sprague-Dawley ラットの上顎右側第一大臼歯を抜去し、ミニインプラントを専用のドライバーを用いて埋入した <sup>3)</sup> (n=4)。使用するインプラント (Le Fort システム Jeil オートスクリーミニ) は、粘膜貫通部 2.0 mm スレッド部 2.0 mm の長径 4.0 mm 直径 2.0 mm のチタン合金製のミニインプラントとした (動物実験倫理委員会承認番号 175 号)。実験スケジュールは、図に示す通りで、骨の評価は、μCT 画像と骨密度によって比較検討した。



#### 実験群

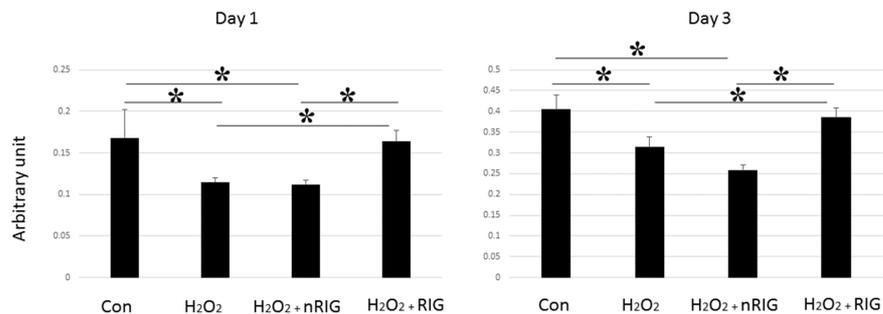
インプラント埋入のみ [control]  
 インプラント埋入後, *Porphyromonas gingivalis* (P.g) を塗布 [Implantitis],  
 Implantitis に nRIG (ニトロキシドラジカル未封入) を添加 [Implantitis @nRIG]  
 Implantiti に nRIG (ニトロキシドラジカル封入) を添加 [Implantitis @RIG]

#### 4. 研究成果

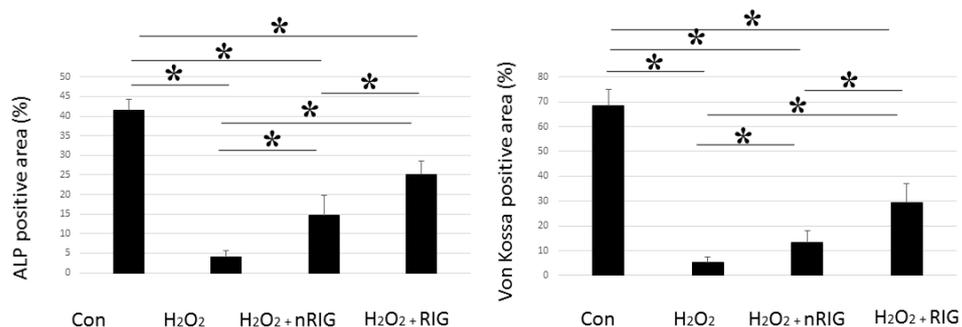
実験 1 ) 37°C でフラワーミセルが崩壊した後にゲル化し, ROS スカベンジャーとしてニトロキシドラジカルが特異的に作用するよう新たに RIG を設計した.

実験 2 ) WST-1 の測定結果より,  $H_2O_2$ ,  $H_2O_2 + nRIG$  群と比較し, RIG を添加した群において, 骨芽様細胞の増殖が確認された. また, Alkaline phosphatase (ALP) activity, staing, Von Kossa stain の結果より, 疑似的な酸化状態と比較し, RIG を添加した群において, 分化の促進が確認された.

#### WST-1: Cell proliferation assay



#### 分化能 (Alkaline phosphatase staing, Von kossa staing) : Day 10



実験群: RIG の添加量は, 1-0.001%

Control

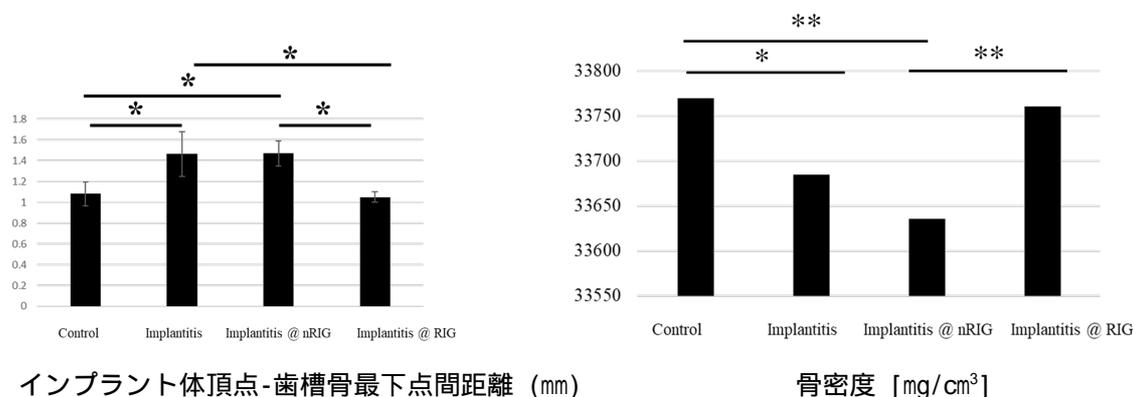
過酸化水素を添加 ( $H_2O_2$ )

$H_2O_2$  に nRIG [ニトロキシドラジカル未封入] を添加 ( $H_2O_2 + nRIG$ )

$H_2O_2$  に RIG [ニトロキシドラジカル封入] を添加 ( $H_2O_2 + RIG$ )

統計学的分析: Tukey 検定による多重比較検定 (Statcel)

実験 3 )  $\mu$ CT 撮影によるインプラント体頂点-歯槽骨再下点間距離の測定結果により, Implantitis, Implantitis @nRIG 群と比較し, RIG を添加した群 (Implantitis @nRIG において, RIG による歯槽骨の吸収抑制が確認された。骨密度計測においても, 同様の傾向が確認された。



以上の結果により, RIG の抗炎症作用は、骨芽様細胞への細胞障害を軽減させるとともに、ラットインプラント周囲炎モデルにおいては RIG の骨吸収抑制作用が認められ、インプラント周囲炎に対する RIG の有効性が示唆された。

#### 引用文献

- 1) Saita M., *et al.* Novel antioxidative nanotherapeutics in a rat periodontitis model: Reactive oxygen species scavenging by redox injectable gel suppresses alveolar bone resorption. *Biomaterials*, 2016, 76, 292-301.
- 2) Ueno T *et al.* N-acetyl cysteine protects osteoblastic function from oxidative stress. *Society For Biomaterials* 2011; 99A: 523-531.
- 3) Atsuta I *et al.* Ultrastructural localization of laminin-5 (gamma2 chain) in the rat peri-implant oral mucosa around a titanium-dental implant by immuno-electron microscopy. *Biomaterials* 2005; 26: 6280-6287.

#### 5 . 主な発表論文等

[学会発表](計 3 件)

小澤僚太郎、齋田牧子、坂上 漿、佐藤武則、丸尾勝一郎、浜田信城、長崎幸夫、木本克彦 . インプラント周囲炎モデルに対するレドックスインジェクタブルゲル抗酸化作用、平成 29 年度日本補綴歯科学会西関東支部、2019 年 1 月 14 日、横浜

小澤僚太郎、齋田牧子、坂上 漿、丸尾勝一郎、長崎幸夫、木本克彦 . インプラント周囲炎に対する Redox injectable gel の骨芽様細胞における抗酸化作用、第 52 回神奈川歯科大学学会総会、2017 年 12 月 2 日、横須賀

小澤僚太郎、齋田牧子、丸尾勝一郎、川股亮太、櫻井孝、木本克彦 . ミニスクリューを用いたラットインプラントモデルの評価検討、第 51 回神奈川歯科大学学会総会、2016 年 12 月 3 日、横須賀

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究分担者

研究分担者氏名：齋田 牧子  
 ローマ字氏名： Makiko Saita  
 所属研究機関名：神奈川歯科大学  
 部局名：大学院歯学研究科  
 職名：助教  
 研究者番号(8桁)：70612943

研究分担者氏名：大野 晃教  
 ローマ字氏名：Akinori Ohno  
 所属研究機関名：神奈川歯科大学

部局名：大学院歯学研究科  
職名：講師  
研究者番号（8桁）：00611633

研究分担者氏名：丸尾 勝一郎  
ローマ字氏名：Katsuichiro Maruo  
所属研究機関名：神奈川歯科大学  
部局名：大学院歯学研究科  
職名：助教  
研究者番号（8桁）：60593639

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。