

令和元年6月3日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20531

研究課題名(和文) ラジカル殺菌技術による再骨結合獲得を目的するインプラント周囲炎治療法の基礎的検討

研究課題名(英文) Basic study of peri-implantitis treatment aimed at reosseointegration using hydroxyl radical

研究代表者

白土 翠 (Shirato, Midori)

東北大学・歯学研究科・助教

研究者番号：60708501

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、過酸化水素光分解殺菌法をインプラント周囲炎治療に応用することにより、インプラント周囲炎の新しい治療法となる可能性を探るための基礎データを構築するために行われた。インプラント表面性状を模したチタンディスクを用いて、本殺菌法がチタン表面に与える影響、本殺菌法の殺菌効果を検証後、マウス由来の骨芽細胞を用いて本殺菌処理によりチタン上での細胞増殖にどのような影響を与えるかを調査した。一連の実験の結果、本殺菌法はチタン表面に対して影響を与えないこと、またバイオフィルムで汚染されたチタン表面を殺菌処理することで骨芽細胞の増殖率を回復することができることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、インプラント治療は盛んに行われるようになった。その一方で、インプラント周囲炎もインプラント治療の普及に伴い増加の一途を辿っている。しかしながら、インプラント周囲炎の理想的な治療法は未だ確立しておらず、予後も良好とは言い難い。

本研究は、難しいとされているインプラント周囲炎治療に過酸化水素光分解殺菌というこれまでにない技術を取り入れることで、新しい適切な治療法として確立することを目的として行った。本治療法が臨床応用され、インプラント周囲炎の治療法として普及すれば、その難治性により苦しんでいる多くの人々のQOLを上げることができ、非常に社会的意義が高い研究であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to evaluate the capability of treatment based on hydroxyl radical for peri-implantitis. In the study, sandblasted titanium discs were used as specimens.

Firstly, treated specimens were observed to investigate the effect of this treatment on a titanium surface. There were not significant differences between treated discs and untreated discs. Then I analysed proliferation of mouse osteoblastic cells (MC3T3-E1) cultured on the treated discs.

Compared with intact discs, biofilm (using *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* and *Streptococcus mitis*) contamination lowered cell proliferation on the specimen surface, whereas this treatment recovered cell proliferation.

These findings suggest that treatment based on hydroxyl radical can recover the degraded biocompatibility of biofilm-contaminated titanium surfaces without damage and can potentially be utilised for peri-implantitis treatment.

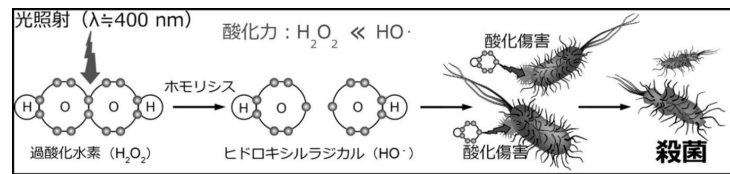
研究分野：活性酸素制御学

キーワード：ヒドロキシルラジカル 過酸化水素光分解 インプラント周囲炎

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

1. 研究開始当初の背景

これまでの研究で、申請者らは過酸化水素の光分解により生成されるヒドロキシルラジカルが持つ高い酸化力に着目し、ヒドロキシルラジカルを応用した殺菌法(図1)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^{1,2)}。更に、本殺菌法は抗生剤等の繰り返し使用で懸念される耐性菌の出現がないことを確認した³⁾。また、安全性の観点では、文献レビューならびに動物試験を通して発がん性等のリスクや刺激性がないことを確認を行った。これらの研究成果から、本殺菌法は歯科疾患に対する新たな治療法としての可能性が示唆された。



一方で、近年の歯科用インプラントの普及に伴い、インプラント周囲炎の罹患率も増加の一途をたどっている。インプラント周囲炎の治療は、インプラントの形状(スクリュー型かつ粗造な表面)上、治療の基本である細菌(バイオフィルム)除去が非常に困難なことから、天然歯に対する歯周病治療に比べ予後が良好ではない。そのため、従来の治療法に代わる適切な方法の確立が求められている。理想的なインプラント周囲炎治療は、バイオフィルムを除去することで炎症を消退させ、インプラント表面への骨結合を再獲得(Re- osseointegration)できる環境を整備することである。先行研究では、従来の機械的清掃に消毒剤を併用する方法等が試みられてきたが、治療の困難さが報告されている。

これまでの研究で過酸化水素光分解殺菌法は、現在臨床で応用されている又は効果が高いと報告されている消毒剤や化学的殺菌法よりも強い殺菌効果を発揮し、バイオフィルムに対しても有効であることが分かっているため、その効果をインプラント周囲炎治療へ応用すれば骨が再結合できる環境へと導けるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では過酸化水素光分解殺菌法のインプラント周囲炎治療への応用の可能性を基礎研究を通して評価することを目的として行われた。本殺菌法は、口腔内の病原性細菌(*Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*など)やそれらで構成されるバイオフィルムに対する高い殺菌効果が確認されている。しかしながら、インプラントに用いられる最も一般的な材料であるチタンに与える影響についてのデータは不十分であった。そこで、インプラント周囲炎治療時に機械的清掃と本殺菌法を併用することを想定し、処理したチタン表面での線維芽細胞および骨芽細胞の活性を評価することで新しいインプラント周囲炎治療法の確立に向けた基礎データの収集を行った。

3. 研究の方法

試料には、直径5mmのチタンディスクを用いた。チタンディスクは、インプラント表面を模した性状にするためサンドブラスト加工(250- μ m アルミナ)を施した後、49%硫酸およびアセトンを使用して表面処理を行った。試験には、オートクレーブにて滅菌したものをを用いた。なお、一連の試料の準備は表面の酸化膜形成を防ぐためすべて試験前日に行った。本研究で行う過酸化水素光分解殺菌処理では、波長365 nmのLEDを光源として使用し、出力は1000mW/cm²とした。また、過酸化水素濃度は3%とした。

(1) 過酸化水素光分解殺菌がチタン表面に及ぼす影響の評価

チタンディスクをランダムに以下の4群に割り付け、処理を行った。過酸化水素に浸漬し光照射(過酸化水素光分解殺菌 H(+)L(+))、超純水に浸漬し光照射(H(-)L(+))、過酸化水素に浸漬し暗所に静置、超純水に浸漬し暗所に静置。処理時間はすべて5分とした。処理したチタンディスクは、未処理のディスクを含めて表面性状、結晶構造についてSEM, AFM, XRD等を用いて分析した。また、37℃で4週間置いたチタンディスクに対して同様の処理(上記 ~)を行い、新しいチタンに処理を行ったものと化学組成および表面ぬれについてXPSおよび接触角計を用いて比較した。

(2) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* バイオフィルムおよび多菌種バイオフィルムモデルの確立と本殺菌法の効果

歯周病の原因菌としてよく知られている *A. actinomycetemcomitans* (JCM2434) を用いた。細菌懸濁液と液体培地(brain heart infusion broth + yeast extract)にチタンディスクを浸漬し、48時間嫌気培養を行いチタン表面にバイオフィルムを形成した。バイオフィルムの形成状態については、共焦点レーザー顕微鏡にて確認した。次に、細菌汚染されたチタン表面の処理を行った。処理は、実際のインプラント周囲炎治療を想定してプラスチックケラールで洗浄後、過酸化水素光分解殺菌法にて行った。対照群として(1)と同様のH(-)L(+), H(+)L(-), H(-)L(-)の他、一般的な消毒剤として0.2% クロルヘキシジンおよび0.5% ポピドンヨードでの処理も条件に加えた。処理後、チタンディスクから残留細菌を酵素(Type コラゲナーゼ、デ

イスパーゼ混合溶液)にて採取し、寒天培地 (brain heart infusion: BHI) 上で培養し生菌数の確認を行った。また、処理後の表面性状については SEM および XPS で評価した。

更に、*Porphyromonas gingivalis*、*Fusobacterium nucleatum*(歯周病原菌)、*Streptococcus mitis*(口腔連鎖球菌)を供試菌とした多菌種バイオフィームモデルを用いて同様の実験を行った。それぞれの細菌懸濁液の混合液と液体培地 (basal mucin medium) にチタンディスクを浸漬し、嫌気状態で培養を行いチタン表面にバイオフィームを形成させた。バイオフィームの状態や殺菌効果については、単一菌バイオフィームと同様の方法で検証した。

(3) 本殺菌処理がチタン表面の再骨結合に与える影響

過酸化水素光分解殺菌法で処理したチタン表面への再骨結合の可能性を評価するため、マウス由来の骨芽細胞 (MC3T3-E1) を用いた実験を行った。はじめに、新しいチタンディスクと経時変化を起こしたチタンディスクを用いて、それらに本殺菌処理を行うことで生じる影響を調べた。次に、インプラント周囲炎治療への応用を考え、単一菌および多菌種から成るバイオフィームで汚染したチタンディスクを用いて同様の実験を行った。条件はこれまでと同様に処理群として H(+)/L(+)、H(-)/L(+)、H(+)/L(-)、H(-)/L(-)、それに未処理群を加えて設定し、処理群には超音波スケーラーを併用した。また、本殺菌法とは別に、一般的に口腔内で使用されている消毒剤 (クワルヘキシジン、ポピドンヨード) も対照群として条件に加えた。設定した条件で処理を行ったチタンディスク上に骨芽細胞を播種して3日間培養し、細胞増殖を MTT 法、NR 法を用いて評価した。

(4) ヒドロキシルラジカルの生成量分析

本研究で行われている、過酸化水素光分解処理にて生成されているヒドロキシルラジカルを定量するため、電子スピン共鳴法 (ESR 法) により生成量の分析を行った。実験群はこれまで同様、H(+)/L(+)、H(-)/L(+)、H(+)/L(-)、H(-)/L(-)とした。過酸化水素または超純水にチタンディスクを浸漬し、スピントラップ剤である DMPO を加え光照射 (または暗所に静置) した後、測定を行った。過酸化水素は最終濃度が 3% になるよう、また DMPO は最終濃度が 300 μ M になるよう調整した。

4. 研究成果

(1) 過酸化水素光分解殺菌がチタン表面に及ぼす影響の評価

H(+)/L(+)¹と H(-)/L(-)²条件下で処理を行ったチタンディスクを、SEM や AFM、光学干渉計によって分析したところ、過酸化水素光分解殺菌がマイクロ・ナノレベルでの表面性状および構造に影響を与えないことが分かった。

また、XPS で分析したところ、4週間置いたチタン (Aged-Ti) 表面は新しいもの (New-Ti) より炭素比率が高くなっていったが、本殺菌処理によって炭素が明らかに減少していた。加えて、接触角を計測したところ経時変化によって疎水性に傾いた Aged-Ti 表面を本殺菌法で処理することで New-Ti とほぼ差がない程度までの親水性回復が認められた。

(2) *A. actinomycetemcomitans* バイオフィームおよび多菌種バイオフィームを形成したチタン表面に対する本殺菌法の効果

チタンディスク上に形成したバイオフィームは、CLSM 上で細菌の存在を確認した。また、多菌種バイオフィームモデルにおいては、SEM 画像上で異なる形状の 3 菌種 (*S. mitis*、*P. gingivalis*、*F. nucleatum*) がディスク上に観察され、多菌種バイオフィームを形成していることが確認できた。

殺菌処理の効果に関しては、併用した超音波スケーラーによる清掃で大部分の細菌は除去されており (*A. actinomycetemcomitans* で 2.2 log-CFU/specimen のみ生存) 過酸化水素光分解殺菌にて処理した群では処理後の生菌数は検出限界 (0.3 log-CFU/specimen) 未満となった。一方、一般的な消毒剤における処理では大きな生菌数減少は認められなかった。また、バイオフィームで汚染されたチタンディスク表面では著しく炭素比率が増加していたが、本殺菌法処理により、汚染されていない新しいチタンディスクと同程度まで炭素比率が減少することが分かった。

(3) 本殺菌処理がチタン表面の再骨結合に与える影響

はじめに、New-Ti と Aged-Ti に殺菌処理を行ったものを比較した。Aged-Ti は New-Ti に比べ、ディスク上での細胞の増殖率が大きく低下していたが H(+)/L(+)¹で処理を行った場合、他の処理群よりも細胞の増殖率が高い傾向がみられた。また、CLSM で観察を行ったところ、細胞増殖が New-Ti と同程度まで回復していることを示唆する結果も得られた。

つぎに、バイオフィームで汚染されたチタンディスク表面を、細菌感染のないものと比較した。細菌汚染したディスク上では、細菌汚染なしのディスクに対して細胞増殖が約 27%低下した。一方、細菌汚染後に過酸化水素光分解殺菌処理を行ったディスクでは細菌汚染なしのディスクに対して約 45%の増加が認められた。更に、細胞増殖率は処理時間に対して比例的に増加することが分かった。口腔内で使用されている一般的な消毒剤を用いて処理を行った場合には、細胞増殖率の回復は認められなかった。バイオフィームは単一菌・多菌種の両方を使用した

結果に大きな差は認められなかった。

(4) ヒドロキシルラジカルの生成量分析

H(+)/L(+)の条件において、ヒドロキシルラジカルの生成が確認された。他条件においても、生成は認められたが非常に微量であった。よって、一連の実験系でヒドロキシルラジカルが生成されていること、本研究で得られたH(+)/L(+)条件下での結果が、過酸化水素光分解由来のヒドロキシルラジカルによるものであることが示された。

本研究により以下のことが明らかになった。

1. 本殺菌法はインプラント表面性状を模したチタン表面に影響を与えない
2. 経時変化や細菌感染により表面に増加した炭素を含む汚染物質を減少させ、疎水性に傾いた性質を親水性に回復する
3. 超音波スケーラーで取り切れない細菌を検出限界未満まで死滅させることができる
4. 本殺菌法でチタン表面を処理することで、汚染により低下した細胞増殖率が回復する
5. これらの効果は過酸化水素の光分解で生成されるヒドロキシルラジカル由来である

これらの知見は、過酸化水素光分解殺菌法をインプラント周囲炎治療へ応用することの有効性、応用できた場合には殺菌のみならず、骨の再結合を導く環境を作ることができる可能性を示唆している。本研究では、当初の目的通り今後の臨床応用に向けた *in vivo* 試験および臨床試験を含む更なる研究を行う上で、非常に有益な基礎データが構築できたと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

- (1) Nakamura K, Shirato M, Tenkumo T, Kanno T, Westerlund A, Örtengren U, Sasaki K, Niwano Y. Hydroxyl radicals generated by hydrogen peroxide photolysis recondition biofilm-contaminated titanium surfaces for subsequent osteoblastic cell proliferation. *Sci Rep*, 9: 4688, 2019 (査読有)
<https://www.nature.com/articles/s41598-019-41126-z>
- (2) Nakamura K, Tenkumo T, Mokudai T, Shirato M, Ishiyama K, Kanno T, Sasaki K, Niwano Y. Potential adverse effects of antimicrobial chemotherapy based on ultraviolet-A irradiation of polyphenols against the oral mucosa in hamsters and wounded skin in rats. *J Photochem Photobiol B*, 187: 96-105, 2018 (査読有)
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30107319>
- (3) 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 in non-surgical treatment for moderate to severe periodontitis: a randomized clinical trial. *Sci Rep*, 7: 12247, 2017 (査読有)
<https://www.nature.com/articles/s41598-017-12514-0>
- (4) Shirato M, Nakamura K, Kanno T, Lingström P, Niwano Y, Örtengren U. Time-kill kinetic analysis of antimicrobial chemotherapy based on hydrogen peroxide photolysis against *Streptococcus mutans* biofilm. *J Photochem Photobiol B*, 173: 434-440, 2017 (査読有)
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28666212>
- (5) Nakamura K, Shirato M, Kanno T, Lingström P, Örtengren U, Niwano Y. Photo-irradiated caffeic acid exhibits antimicrobial activity against *Streptococcus mutans* biofilms via hydroxyl radical formation. *Sci Rep*, 7: 6353, 2017 (査読有)
<https://www.nature.com/articles/s41598-017-07007-z>
- (6) Nakamura K, Shirato M, Kanno T, Örtengren U, Lingstrom P, Niwano Y. Antimicrobial activity of hydroxyl radicals generated by hydrogen peroxide photolysis against *Streptococcus mutans* biofilm. *International J Antimicrob Agents* 2016;48:373-80. (査読有)
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924857916301637>

〔学会発表〕(計 6 件)

- (1) 白土翠、中村圭祐、天雲太一、菅野太郎、庭野吉己. *Streptococcus mutans* バイオフィルムが引き起こす歯質脱灰に対する過酸化水素光分解殺菌技術の効果. 第 45 回日本防菌防黴学会年次大会 2018 年 11 月 東京
- (2) 中村圭祐、天雲太一、目代貴之、白土翠、石山希里香、菅野太郎、佐々木啓一、庭野吉己. カフェイン酸に対する UV-A 照射で得られる殺菌作用と口腔粘膜刺激性の評価. 第 45 回日本防菌防黴学会年次大会 2018 年 11 月 東京
- (3) 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 in Sendai, Japan*, Jan. 2018

- (4) Nakamura K, Shirato M, Kanno T, Lingström P, Örtengren U, Niwano Y. Anti-biofilm effect of hydroxyl radicals generated in UVA-irradiated caffeic acid. Presented at CED-IADR/NOF Oral Health Research Congress in Vienna, Austria, Sep. 2017
- (5) Shirato M, Nakamura K, Kanno T, Lingström P, Niwano Y, Örtengren U. Comparison of antimicrobial activity of hydrogen peroxide photolysis against *Streptococcus mutans* biofilm with photodynamic therapy. Presented at CED-IADR/NOF Oral Health Research Congress in Vienna, Austria, Sep. 2017
- (6) 中村圭祐、白土翠、菅野太郎、庭野吉己 . 齧蝕原因菌 (*Streptococcus mutans*) のバイオフィルムに対する長波長紫外線照射の殺菌作用 . 日本防菌防黴学会 第 44 回年次大会 2017 年 9 月 豊中

〔その他〕

ホームページ等 : <http://www.free-radical.dent.tohoku.ac.jp/achievement.html>

6 . 研究組織

研究協力者

- (1) 研究協力者氏名 : 庭野 吉己
ローマ字氏名 : (NIWANO, yoshimi)
- (2) 研究協力者氏名 : 中村 圭祐
ローマ字氏名 : (NAKAMURA, keisuke)
- (3) 研究協力者氏名 : 天雲 太一
ローマ字氏名 : (TENKUMO, taichi)

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。