

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09685

研究課題名（和文）過硝酸溶液を用いた新規殺菌方法のインプラント周囲炎治療法への応用

研究課題名（英文）Investigation of a novel sterilisation method by peroxyntic acid for peri-implant infection

研究代表者

江崎 大輔 (Esaki, Daisuke)

九州大学・歯学研究院・共同研究員

研究者番号：10608970

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、titanium 表面に形成されたバイオフィルムに対する過硝酸(HOON₂; PNA (Peroxyntic acid))の殺菌効果について検討した。CFU assayの結果、2.3 mmol/L以上の濃度のPNAでは、菌数が10秒で検出限界以下となった。他の消毒薬と比較し、PNAが、細菌汚染したtitanium表面のバイオフィルムの殺菌に有用であることが示唆された。

さらにPNAによる歯科用印象材の殺菌効果についても検討した。菌数は10分で検出限界以下となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯科インプラント治療は歯科補綴治療の選択肢として必要な位置を占める治療法である。しかし、近年インプラント周囲炎の問題が大きく取り上げられており、その治療法についても絶対的な方法はない。そこで過硝酸の殺菌効果に着目し、インプラント周囲炎の治療法に応用するための基礎実験を行い、良好な結果を得た。過硝酸の歯科材料の消毒への応用を目指した基礎実験もを行い、良好な結果を得た。

研究成果の概要（英文）：This research evaluated the bactericidal effects of peroxyntic acid (HOON₂; PNA) on biofilms formed on titanium surfaces. Streptococcus gordonii was cultured on titanium discs that were then used to evaluate the bactericidal effects of PNA. Using low concentration of PNA, the bacterial count based on a CFU assay reached an undetectable level within 10 s. Bacillus subtilis solution was coated on the dental model, and impression taking of the model was done by dental impression material. Dental impression material was disinfected by PNA, and bactericidal effects were evaluated. The bacterial count based on a CFU assay reached an undetectable level within 10 minutes.

PNA is useful for sterilizing biofilms on titanium surfaces and dental impression material that have been contaminated with bacteria.

研究分野：歯科インプラント

キーワード：歯科インプラント治療 インプラント周囲炎 過硝酸

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯科インプラント治療は高い成功率が報告されている歯科補綴治療の一つである。一方、インプラント周囲の炎症という生物学的偶発症が多く報告されている。天然歯と比較してインプラントは、周囲軟組織の封鎖が弱く感染しやすい状態にあり、感染により周囲ポケットが深化し嫌気性環境となることにより細菌増殖が起り骨吸収が惹起される。これがまさにインプラント周囲炎の病態である。

インプラント周囲炎に対する治療法は、Langらが提唱する累積的防御療法が一般的である。すなわち、プラークの蓄積、ポケット深さ、エックス線写真による辺縁骨の骨頂部の変化に基づき、機械的清掃および研磨を行い、インプラント表面に付着しているバイオフィーム、石灰化物等の汚染物質を取り除き、起炎物質を除去する。さらに病状が悪化した場合、殺菌洗浄、抗菌薬投与(局所・全身)を行い、最終的に外科処置へ移行する。機械的除去療法、殺菌療法、抗菌療法、外科療法を累積的に組み合わせる治療方針が推奨されているが、具体的な方法は確立していない。機械的除去療法に関しても、様々なインスツルメントが登場してきたが、インプラント体のスレッド構造や粗面、骨欠損の病態によっては、付着した細菌由来のバイオフィームの完全除去は困難である。バイオフィームの殺菌療法に着目したが、既存の殺菌剤ではバイオフィームの完全殺菌は困難であり、新たな殺菌技術の開発が必要と考えた。

大気圧プラズマを使用した殺菌治療は、消毒、創傷治癒、止血、癌治療への適用が期待されている。一般的には、細菌は液中に存在し、直接プラズマを照射できない為殺菌が困難であると考えられる。大阪大学の北野らの研究グループは、液体のpHを4.8以下の酸性条件にすることにより菌数を一桁減らす時間であるD値を100分の1にするという技術の開発(低pH法)に成功した。原理は、プラズマから供給された活性酸素の一種であるスーパーオキシドアニオンラジカルが酸性条件下で酸解離平衡によりプロトン化しヒドロキシラジカルに変化し、電氣的に中性であるHOOが細胞膜を透過し、細胞内部へ酸化ストレスを与えることによる殺菌作用である。歯科領域での応用に関する報告も散見される。しかし、プラズマの直接照射は、臨床応用を考えた場合、特別な装置が必要であること、殺菌に要する時間も長いという欠点(180秒)等により難しい。事前に純水にプラズマ照射を行ったプラズマ処理水を作製し、ヒト抜去歯象牙質齶蝕モデルの窩洞に応用し高い殺菌効果を得られるという報告があり、直接のプラズマ照射よりも、プラズマ処理水が高い殺菌作用があることが示された。北野らのグループは、プラズマ処理水が低いpH条件下で高い殺菌活性を示し、その半減時間が高い温度依存性を示すこと、物理化学的特性値よりその殺菌の活性種が過硝酸であることを発見した。過硝酸の化学合成は比較的容易であり、プラズマ照射のステップも必要なく、簡便に臨床応用が可能となる可能性がある。

2. 研究の目的

劇薬レベルの高い殺菌能力を持ちながらも、体温程度の温度で数秒以内に失活する過硝酸溶液を応用した新規殺菌法の確立を行うことを目的とした。

さらにインプラント治療のみならず歯科治療で用いる材料の消毒に用いることにより適用範囲の拡大を目指すことも目的とした。

3. 研究の方法

(1) バイオフィーム培養下での過硝酸濃度溶液の違いと生菌数の変化に関する解析

・Titanium ディスクの準備

JTS2 種純 titanium ディスク (直径 12.0mm, 厚さ 1.5mm: Sky・Blue, Fukuoka, Japan) に対して機械仕上げ処理 (machined surface: MS)、アルミナサンドブラスト-エッチング処理 (rough surface: RS) を行ったものを使用した。RS は、MS に対して、インプラント表面直径 50 μm のアルミナ粒子を用いてサンドブラスト処理を行い、蒸留水にて十分に洗浄後、15%フッ化水素酸水溶液中に 25°C で 30 秒間浸漬し、さらに蒸留水で十分に水洗し、95.5%硫酸と 31.3%塩酸を 1:1 に混合した溶液に 3 分間浸漬した。その後、蒸留水で十分に洗浄を行った。なおこれらの titanium ディスクは、実験に使用する前に、滅菌パックに個包装後、 γ 線滅菌を行い、使用直前に開封して用いた。

・ペリクルの形成

健康成人ボランティア 4 名 (男性 2 名、女性 2 名) から安静時唾液を採取し、不純物を除去するために Hirota らの方法に則り、4°C、12000 G で 20 分間遠心分離後、遠心上清を回収しフィルター滅菌 (Millex® HA 0.45 μm ; Merck Millipore, Billerica, MA, USA) を行った。この滅菌した 4 名の唾液を等量ずつ混合したものを試験用唾液とした。実験には、titanium ディスクを 12 穴プレート (Falcon®, Corning, NY, USA) の各ウェルに設置し、2mL の試験用唾液を添加して 5% CO₂ 大気圧下 37°C に 30 分静置して、ペリクルの形成を行った。titanium ディスクの操作は全て無菌的操作下で行った。プロトコールは、九州大学倫理委員会 (倫理委員会承認番号: 22010) で承認されている。

・培養条件と供試菌株

Titanium ディスクに付着させる菌として *Streptococcus gordonii* (ATCC 10558 株, 以下 *S. gordonii*) を使用した。*S. gordonii* は、血液寒天培地から単一コロニーを選択回収し、Brain Heart Infusion Broth (BHI; Difco™, Grand Island, NY, USA) 液体培地を用いて播種、攪拌し、5% CO₂ 大気圧下 37°C で培養を行った。

・Titanium ディスク上でのバイオフィーム形成

培養後の菌液から集菌した *S. gordonii* を BHI 7ml (+1% glucose 140 μL) 中に播種し、ペリクルを形成した titanium ディスクの入ったウェルから試験用唾液を除去し、BHI 菌液 50 μL を加えて 5% CO₂ 大気圧下 37°C に 24 時間静置することでバイオフィームを形成させた。バイオフィーム形成後の titanium ディスクを BHI 菌液中から PBS 中に移し、新しい PBS で 2 度軽く洗い流し、新しいウェル内に静置した。

・過硝酸 (PNA) 合成

PNA 溶液は、1.0 M HNO₃ 45 μL と 6.0% H₂O₂ 60 μL を混合して氷冷したものに 10% NaNO₂ を 50 μL 添加することで合成した。得られた溶液の PNA 濃度は 120 mM であった。この PNA 溶液を希釈して 4.6 mmol/L, 2.3 mmol/L, 0.92 mmol/L 濃度の PNA 溶液を各々作成した。全ての希釈においては、蒸留水と終濃度 20 mM クエン酸 buffer を使用した。pH を 3.2 に維持するために 20 mM クエン酸 buffer を含めた PNA 溶液を作製した。なお、PNA の合成、希釈は殺菌試験の直前に行った。

・過硝酸 (PNA) 不活化

初発濃度 4.6 mmol/L の PNA 溶液を作成後、27°C 室温にて 24 時間静置することで PNA を完全に分解させたものを不活化 PNA 溶液とした。この不活化 PNA 溶液は、CFU Assay にて完全に失活したことを確認している。

・バイオフィーム殺菌

生理食塩水 (NS; Normal Saline, Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd, Tokyo, Japan)、

0.025% 塩化ベンザルコニウム (BZC; Benzalkonium Chloride Disinfectant Solution, Yoshida Pharmaceutical Co., Ltd, Tokyo, Japan)、0.2% クロルヘキシジングルコン酸溶液 (CHX; Chlorhexidine digluconate solution, SIGMA-ALDRICH, Pharmaceutical Co., Ltd, Tokyo, Japan)、4.6 mmol/L、2.3 mmol/L、0.92 mmol/L の PNA 溶液、失活 PNA 溶液、7 種類の薬液比較を行った。各群 9 枚のバイオフィーム形成後の titanium ディスクを静置したウェルに、各薬液 2 mL を加え、0、10、20、30 秒と薬液処理後、殺菌反応を停止させるため、Soybean-Casein Digest Broth with Lecithin & Polysorbate 80 (SCDLP; broth, Nihon Pharmaceutical Co., Ltd, Tokyo, Japan) を薬液と同量の 2 mL 加えた。その後、PBS にて洗浄した。どの過程においても、バイオフィームが剥離しないように、静的に操作を行った。

各群 9 枚の各薬液処理後の titanium ディスクを 900 μ L の BHI が入った 1.5 mL 用のマイクロチューブに入れ、チューブミキサーで攪拌し titanium ディスクからバイオフィームを剥離させた。その懸濁液を段階希釈後、BHI 寒天培地にて 3 日間、5% CO₂ 大気圧下 37°C で培養し colony forming unit (CFU) にて生菌数の評価を行った。

(2) 過硝酸によるインプラント治療関連材料の消毒

背景

口腔内で採得した印象材は体液や病原体に汚染されており消毒が必要である。日本補綴歯科学会発行の補綴歯科治療過程における感染対策指針によると、0.1-1% 次亜塩素酸ナトリウム溶液に 15 分から 30 分の浸漬、2-3.5% グルタルール溶液に 30 分から 60 分の浸漬を行うことが推奨されているが、それぞれ有機物による殺菌効果の減少・金属腐食、そして刺激臭・皮膚の化学熱傷が問題となる。そこで求められる特性として、高い殺菌力に加え、高い安定性、そして低い変形を防止するための短時間処理が重要であると考えられる。そこで、印象材の過硝酸による殺菌を提案するためのデータ収集を行うこととした。

材料と方法

- ・従来研究に比べ殺菌が困難な芽胞菌を塗布したモデルの構築

Bacillus subtilis の芽胞液を歯列モデルに塗布し、アルジネート印象採得を行い、印象体へ菌を転写した。過硝酸液の濃度は動物実験で安全性が確認されている 100mM とした。



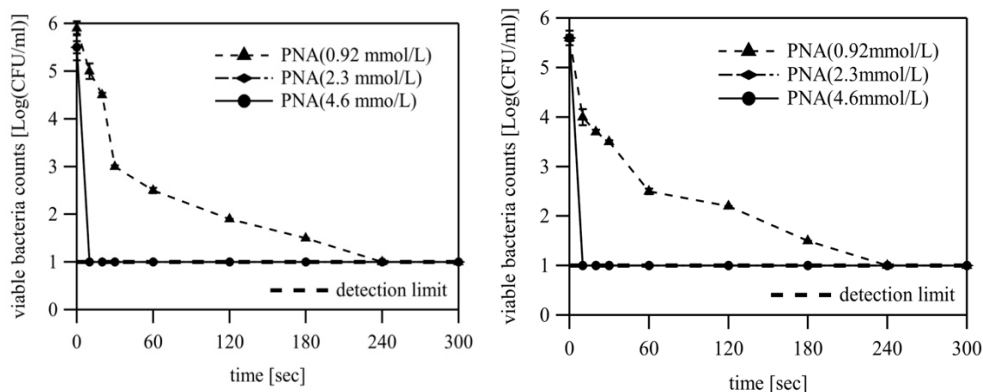
過硝酸溶液中に印象体を浸漬し、スターラーで攪拌し殺菌を行った。界面活性剤入りの培地ごとストマッカー袋に入れ震盪して菌を洗い出した。DFU アッセイにより生菌数の評価は混液により 1ml を 10 枚のプレートに播種することにより行った。

4. 研究成果

(1) バイオフィーム培養下での過硝酸濃度溶液の違いと生菌数の変化に関する解析 MS 群と RS 群の titanium 表面への各種 PNA 濃度の殺菌時間と平均数の変化を示す (Fig9, 10)。P NA 群 (4.6 mmol/L, 2.3 mmol/L) は、10 秒から検出限界以下、

PNA 群(0.92 mmol/L)は、30 秒以降減少傾向にあり、240 秒から検出限界以下となった。MS 群、RS 群での差は認められなかった。

・MS (左) RS 表面 (右) バイオフィーム培養下での各種 PNA 濃度の殺菌力の比較



小括

- ・ 2.3mmol/L 以上の PNA 溶液では、短時間で高い殺菌力を示した。
- ・ 0.92mmol/L の PNA 溶液で、CHX と同程度の殺菌力を示した。

PNA は半減期の温度依存性が極端に高いという物理化学的特徴があり、氷温では数十分の半減期であるのに対して、体温では数秒で速やかに失活し無害化するため、残留毒性が限りなく低いと考えられる。ただし、口腔内で予想される欠点として、寿命が短いため菌周ポケット深くまで長時間かけて浸透させることが難しいことが挙げられる。対策として、殺菌部位を露出させ、できる限り機械的清掃を行うことで、PNA 溶液および殺菌対象部位の温度を下げておくこと、あらかじめ殺菌部位を酸性にしておくことなどが必要であると考えられる。また、本来 PNA は寿命が短いため使用直前に合成する必要があるが、冷凍することで長期間の保存することも可能である。プラズマ処理水に比べてコストも低く加えて、安全性においても、動物実験にて、高濃度 PNA 溶液で為害性のない予備的な結果が出ている。大量合成が可能であり、低濃度でも高い殺菌力を示すことから医療での利用価値が非常に高い。このことから、従来の消毒薬に変わる、新たな殺菌技術として期待される。

(2) 過硝酸によるインプラント治療関連材料の消毒

5 分で 3 分の 1 が無菌化し、10 分殺菌では全て無菌化し、4 桁の菌数低下が確認できた。

小括

芽胞菌を塗布した歯列モデルをアルジネートを用いた印象採得を行い、印象体を過硝酸で殺菌し、10 分の処理で無菌化に成功した。ヒトの口腔内は栄養細胞のみであることを考慮すると、より短時間での無菌化が期待できる。スプレー塗布により使用量を減少させることも可能であると考えている。安全性も担保されている濃度であるため、臨床現場で気軽に利用可能であると思われる。塗布した菌数と比較して回収された菌数が少ないため、転写効率ならびにアルジネートへの埋め込みに関する可能性も検討が必要である。埋め込まれた菌が石膏注入により出現する可能性は低いと考えているが、さらなる検討が必要である。印象体の変形に関する評価が今後の課題であるが、従来の消毒液と比較して短時間での処理が可能であるため、膨潤効果が少なく、問題は少ないと期待している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 NAGAO Rei, ESAKI Daisuke, SHIBATA Yukie, IKAWA Satoshi, KITANO Katsuhisa, AYUKAWA Yasunori, MATSUSHITA Yasuyuki, TAKESHITA Toru, YAMASHITA Yoshihisa, MATSUZAKI Masaaki, KOYANO Kiyoshi	4. 巻 38
2. 論文標題 Investigation of a novel sterilization method for biofilms formed on titanium surfaces	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Dental Materials Journal	6. 最初と最後の頁 654 ~ 662
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4012/dmj.2018-274	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	都留 朋子 (Tsuru Tomoko) (40823612)	九州大学・大学病院・医員 (17102)	
研究分担者	松下 恭之 (Matsushita Yasuyuki) (60159150)	九州大学・大学病院・准教授 (17102)	
研究分担者	鮎川 保則 (Ayukawa Yasunori) (50304697)	九州大学・歯学研究院・教授 (17102)	
研究分担者	古谷野 潔 (Koyano Kiyoshi) (50195872)	九州大学・歯学研究院・特別教員 (17102)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	神野 洋平 (Jinno Yohei) (40507779)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関