

抗菌活性イオンを担持したジルコニアインプラントの抗菌性評価

Evaluation of antimicrobial activity of zirconia implants loaded with antimicrobial ions

入口俊介¹⁾, 友原太郎¹⁾, 中村仁¹⁾, 山崎亮太²⁾, 前田憲成¹⁾

¹⁾九州工業大学 大学院生命体工学研究科, ²⁾九州歯科大学 健康増進学講座 感染分子生物学分野
Shunsuke Iriguchi¹⁾, Taro Tomohara¹⁾, Jin Nakamura¹⁾, Ryota Yamasaki²⁾, Toshinari Maeda¹⁾

¹⁾ Department of Biological Functions Engineering, Graduate School of Life Science and Systems Engineering,
Kyushu Institute of Technology,

²⁾ Division of Infections and Molecular Biology, Department of Health Promotion, , Kyushu Dental University

E-mail address: toshi.maeda@life.kyutech.ac.jp

1. はじめに

歯周病は全身疾患にも関連する口腔内感染症であるため、健康寿命を延ばすために医療現場では様々なインプラント材料が利用されてきた。特に、超高齢化社会を迎えた日本にとって、口腔機能の維持のために歯科インプラントが果たす役割は大きくなってきており、求められる主な機能として、「生体親和性」、「審美性」、「抗菌性」の3つが挙げられる。40年以上にわたり、歯科インプラント材料としてチタン合金が選択されてきたが、ジルコニアは生体不活性セラミックス材料でありながら、優れた機械的強度や高い耐食性、さらには外観の審美性を持つことからインプラント材料として特に注目されている[1]。また、銀イオンや亜鉛イオンなどの無機イオン種は、抗菌スペクトルが広く多様な化合物に容易に組み込むことが可能であり、従来から無機材料の抗菌化に用いられてきた。しかし、ジルコニアは無機イオンの配位や結合を持たせるための構造を持たず、元素を担持させることが出来ない。そこで、本研究では、層状の構造を持つことから、特定のイオンを選択的に取り込み、徐放することのできる α -リン酸ジルコニウム(以下、 α -ZrP)を用いた(Fig. 1)。骨形成因子として知られる亜鉛イオンや抗菌活性の強い銀イオンを担持させ、「生体親和性」、「審美性」、「抗菌性」を兼ね備えたセラミックス材料を実現させようと考えた。抗菌性並びに細胞毒性の評価には、歯科インプラント表面を再現するため、ポリエチレン基板に材料を熱転写する方法を用いた。さらに、抗菌性の評価には大腸菌などの非歯周病関連菌が選択されるが、本研究では、歯周病関連菌を用いた抗菌性試験を試みた。本稿では、亜鉛イオン含有量による骨芽細胞への細胞応答性と、合成した3種の α -ZrPの歯周病関連菌への抗菌性について述べる。

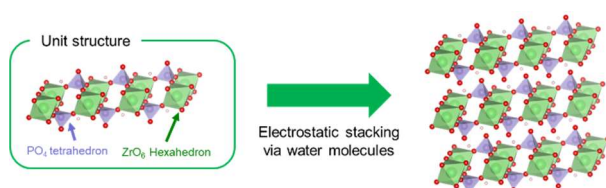


Fig. 1 α -ZrP の結晶構造

2. 方法

2. 1 α -ZrP の合成及びイオンの固定

オキシ塩化ジルコニウム八水和物 4.0 g を 85%リン酸 31.95 mL と 9.3 mL の超純水の混合水溶液に溶解した。24 時間 150°C で水熱合成を行い、pH $\geq$ 3 まで遠心分離し (11,000 rpm, 5 min, 10 °C)、乾燥させ α -ZrP を得た。 α -ZrP 1.0 g と 0.74 g の酢酸亜鉛二水和物を 83.33 ml の超純水に溶解し 110°C で 4 日間還流した。その後遠心分離と再分散により洗浄し乾燥させ試料 α -ZrP+Zn²⁺-100 を得た。また、硝酸銀を 0.74 g、超純水を 83.33 ml 加え、110°C で 3 日間還流し、 α -ZrP+Ag⁺を作製した。 α -ZrP+Zn²⁺-100 は理論イオン交換容量である 6.64 meq/g の全てに対応する量の亜鉛を添加している。亜鉛イオン含有量による細胞応答を評価するため、50%のイオン交換容量である α -ZrP+Zn²⁺-50 も作成した。これらの3種の試料は、エタノールに懸濁し、ホットプレートで加熱したアルミホイル上に噴霧した後、PE 基板に熱転写することで、PE 基板への担持を行った。基板は任意の形で切り出し、細胞毒性試験や抗菌性試験に使用し、走査型電子顕微鏡(SEM, S-3500N 日立)と FT-IR(FT/IR-4200, JASCO)を用いて評価した。

2. 2 細胞応答試験

歯科インプラントの固定には骨芽細胞の活性が必須であるため、本研究では、マウス頭蓋冠由来細胞 (MC3T3-E1)を用いた。96 well プレートに 2.1 の方法で作成した PE、 α -ZrP、 α -ZrP+Zn²⁺-50 および α -ZrP+Zn²⁺-100 基板を装着し、細胞懸濁液を 200 μ L ずつ滴下した。MC3T3-E1 を用いて Fetal Bovine Serum 含有 MEMa 培地で前培養を行い、初期細胞濃度 3.0×10^4 cells/mL となるように細胞懸濁液を作成した。細胞増殖性については Cell Counting Kit-8(同仁科学研究所)を用い、細胞毒性については Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST(同仁科学研究所)を用いることで評価を行った。

2. 3 抗菌性試験

歯周病は口腔内細菌が蓄積し、形成されたプラークによ

る炎症が引き起こされることが原因であるため、本研究では、歯周病関連菌である *Candida albicans* ATCC 18804 [2], *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586, *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556 を用いた。96 well プレートに 2.1 の方法で作成した PE、 α -ZrP、 α -ZrP+Ag⁺ および α -ZrP+Zn²⁺-100 基板を装着し、各菌液を 200 μ L ずつ滴下した。菌液は、ヘミン・メナジオン含有 GAM 培地を用いて前培養した後、滅菌水で 3 回洗浄し、初期濁度(OD600)を 0.1 に合わせた。*C.albicans* については好氣的に培養し、他の 2 菌株については嫌氣的に 1~24 時間培養した後、ヘミン・メナジオン含有 GAM 血液寒天培地に培養液を播種し、菌数測定を行い抗菌性の評価を行った。Table. 1 に使用した培地の組成を示す。

Table. 1 ヘミン・メナジオン含有 GAM 培地

ヘミン	5 mg/L
メナジオン	1 mg/L
N-アセチルムラミン酸	10 mg/L
アディキュア™GAM ブイヨン	59 g/L

※オートクレーブ 115°C, 15 min

(オートクレーブ後に、ウマ脱繊維血液を終濃度 5% になるように加えることで、血液寒天培地を作成した。)

3. 結果と考察

3. 1 基板の作成

FT-IR 測定により、 α -ZrP、 α -ZrP+Zn²⁺-50 および α -ZrP+Zn²⁺-100 を熱転写させた試料において P-O 伸縮振動 (1050 cm⁻¹) に由来する吸収が観察されたため、PE 基板上にそれぞれの粉末が埋め込まれたと考えられる。試料表面の SEM 像について、PE 基板表面を基準として考えると α -ZrP、 α -ZrP+Zn²⁺-50、 α -ZrP+Zn²⁺-100 のそれぞれの試料は明るいコントラストを示す部分が点在していることから、それぞれ粉末が基板表面に存在していると言える(Fig. 2)。

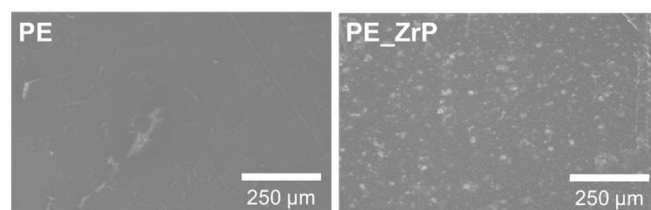


Fig. 2 基板表面の SEM 像 (PE, α -ZrP)

3. 2 細胞応答試験

CCK-8 の吸光度の結果より、コントロールに匹敵する細胞の増殖性を示したのは α -ZrP+Zn²⁺-100 だけであった。SEM 像からも α -ZrP+Zn²⁺-100 基板表面は他の基板に比べてより広い領域にわたり粒子が埋め込まれており、細胞の多くが粉末表面を介して基板に接着し、増殖していると考えられる。また、LDH の結果より意図的に細胞を

破壊したコントロールと比較すると α -ZrP、 α -ZrP+Zn²⁺-50 および α -ZrP+Zn²⁺-100 の 3 サンプルにおいて死細胞数が有意に少なかったが PE は有意な差は認められなかった。このことから α -ZrP、 α -ZrP+Zn²⁺-50 および α -ZrP+Zn²⁺-100 の粉末は細胞毒性が低いことがわかる。

3. 3 抗菌性試験

C. albicans ATCC 18804 について α -ZrP+Ag⁺ は強い抗菌活性を示したが、 α -ZrP 及び α -ZrP+Zn²⁺ についてはコントロールである PE と同程度であった。*F. nucleatum* ATCC 25586 と *S. sanguinis* ATCC 10556 については、時間経過につれて寒天培地でカウントできるコロニー数が減少していった。2 菌株とも容易に付着する特性を持つことから、基盤表面への強力に付着していることが示唆された[3]。

4. おわりに

α -ZrP に骨形成因子として知られる亜鉛イオンや抗菌活性の強い銀イオンを担持させたセラミックス材料の合成に成功した。亜鉛イオンを担持した材料上で骨芽細胞がイオン交換容量に依存したポジティブな増殖と低い細胞毒性を示したことから、骨芽細胞の成長を促進する次世代のセラミックス材料として期待できる。しかしながら、歯周病関連菌への抗菌性試験では亜鉛イオンを担持させた材料での抗菌性は認められなかったため、基板表面への転写量の増加の必要性が考えられる。また、付着性細菌に対する寒天培地への播種による菌数測定は困難であるため、MTT 法[4]などの代謝活性を評価する方法での評価が妥当であると考ええる。

5. 謝辞

本研究はクラウドファンディング「九工大に学生主体の研究ブームを巻き起こしたい！」の資金援助により実施されています。ご支援していただいた方に感謝申し上げます。

参考文献

- [1] Rita Depprich et al., Head Face Med, 2008, 4, Article number 30
- [2] Brahim Jabri et al., Int. J. Dent, 2021, vol 2021, issue 1
- [3] Cindy Nabert-Georgi et al., Clin Exp Dent Res, 2018, vol 4, issue 3, p 72-77
- [4] T. Mosmann, J. Immunol. Methods, 1983, 65, 55.