



Title	Characterization of minocycline-carbon nanohorn conjugates and their antibacterial activity [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	前田, 由佳利
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第13855号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/78489
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yukari_Maeda_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学） 氏 名 前田 由佳利

学 位 論 文 題 名

Characterization of minocycline-carbon nanohorn conjugates and their antibacterial activity

（ミノサイクリン - カーボンナノホーンの複合体の製作ならびにその静菌効果について）

キーワード（5つ）、カーボンナノホーン、ミノサイクリン、インプラント周囲炎、静菌性、局所薬物送達療法

カーボンナノホーン(CNHs)は、直径は 2～5 nm、長さ 40～50 nm で不規則な形状を持ち、数千本が集合して直径 100 nm 程度の球形集合体を形成している。金属触媒を使用しないという理由から、生体適合性が比較的高いことが報告されている。また CNHs は酸化により多孔性となり、吸着面積が約 4 倍となることから、この特徴を用いて、薬物の輸送用担体としての応用が広く研究されている。我々はこれまでに CNHs を貪食したマクロファージが、骨芽細胞の分化を促進することを報告した。この特徴を用いることで、歯科インプラント体の表面修飾への応用が期待される。一方でインプラント周囲炎は、インプラント治療における最も大きな問題である。インプラント周囲炎治療に頻用される抗生剤はミノサイクリン (MC) であり、局所薬物送達療法に用いられているが、効果を持続させるには、局所への貯留が課題である。そこで、MC を CNHs に担持させることにより、MC の局所貯留が可能となり、静菌効果の持続が期待できると考えた。本研究では CNHs の酸化の有無による MC 担持能の違いと静菌作用を比較検討した。

MC1mg を蒸留水 10mL に溶解し、MC 水溶液を作製した。粉末状の CNHs（未酸化：as-CNH、酸化：CNHox550）1mg に MC 水溶液を添加し、冷水中にて 2 時間超音波分散を行った。これにより MC-CNHs 複合体 (MC/CNHs) を製作し、TEM にて観察した。吸光度測定・熱重量解析を行うことにより CNHs の MC の担持を確認し、CNHs の徐放能を検討するため、透析を行った。MC/CNHs の薬効を調べるため、細菌培養 (*Streptococcus mutans* および *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) を行う地ともに、細菌培養 20 時間後に SEM・TEM 撮影を行った。さらに、MC/CNHs の骨芽細胞への影響を確認するため、増殖率と ALP 活性を計測した。

CNHs は分散性が低いことが知られているが、MC 水溶液と CNHs を混和することにより分散性が向上した。TEM 観察により CNHs 周囲に MC と思われる構造が確認された。吸光スペクトル測定では、MC 低濃度付加条件下では MC 由来の吸光ピークが認められず、

CNHs 酸化の有無により異なる閾値以上の濃度で MC 由来ピークが確認された。熱重量分析測定では MC/CNHs を燃焼した際に MC の脱離に起因する重量減少が認められた。以上より、CNHs を MC 水溶液とともに超音波処理することで、CNHs の分散性向上と MC の担持が可能であると確認された。透析処理による MC 放出量の計測を行った結果、CNHs への担持によりの MC の放出量が減少した。さらに MC 担体では透析処理後 24 時間以内にはほぼ全量が透析膜を通過し拡散するのに対し、MC/as-CNH では 24-48 時間で顕著な溶出、MC/CNHox550 では 7 日後まで微量ながら連続的な溶出が見られた。このことから、CNHs の有無および前酸化処理に依存して MC 放出量が変わることが明らかとなった。MC/as-CNH あるいは MC/CNHox550 存在下において *S.m.* 菌と *A.a.* 菌の培養を行ったところ、MC 単体と MC/as-CNH では同等の細菌増殖抑制効果を認められたのに対し、MC/CNHox550 では効果の減弱が確認された。SEM 観察では、死滅細菌を取り巻くように CNHs が認められ、TEM 観察では、死滅細菌の細胞壁に接するように CNHs が認められた。以上より、MC/CNHox550 では MC の一部は CNH 内部に存在していること、細菌抑制効果の減弱から、表面の MC が静菌効果を示し、内部に入り込んだ MC は細菌増殖抑制効果には関与しないことが推察された。

また、骨芽細胞培養 7 日後の DNA 量、ALP 活性は、MC および CNHs を添加していないコントロール群と as-CNH、CNHox550、MC/as-CNH、MC/CNHox550 添加群との間に有意差はみられないことから、MC の CNHs への担持による骨芽細胞の増殖および分化に対する影響は低いと考えられた。

本研究の結果、MC 水溶液に CNHs を添加することにより MC を担持した MC/CNHs を製作することが可能となった。MC-as/CNHs は MC 単体と等しい静菌性を有していることが明らかとなり、局所応用の可能性が示唆された。