



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Near-infrared light-boosted antimicrobial activity of minocycline/hyaluronan/carbon nanohorn composite toward peri-implantitis treatments [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	小西, 大輔
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第16440号
Issue Date	2025-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/94861
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Daisuke_Konishi_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 小 西 大 輔

学 位 論 文 題 名

Near-infrared light-boosted antimicrobial activity of minocycline/hyaluronan/carbon nanohorn composite toward peri-implantitis treatments

（ インプラント周囲炎治療を目的とした近赤外光応答性ミノサイクリン／ヒアルロン酸／カーボンナノホーン複合体の抗菌効果の検討 ）

キーワード（5つ）光熱効果，ミノサイクリン，ヒアルロン酸，ナノカーボン，カーボンナノ物質

インプラント治療は予知性が高く，効果に優れる治療方法であるが，臨床においては，インプラント周囲炎が大きな問題となっており，治療法も十分には確立されていないため，インプラント周囲炎に対する効果的な治療法の開発が急務とされる．カーボンナノホーン（CNH）は，炭素のみからなる新素材であり，高い生体適合性を有し，表面に薬剤担持が可能であることから，薬物送達システム（Drug Delivery System）への応用が期待されている．また，CNH は，近赤外光を吸収する光熱効果を持つことから，本研究ではこの特性を利用し，インプラント周囲炎の治療に応用するために，ミノサイクリン／ヒアルロン酸／CNH（MC/HA/CNH）複合体を開発し，近赤外光を用いて殺菌作用を検討した．

MC5mg を脱イオン水 1 mL に溶解し，MC 水溶液を作製した．また，HA 1 mg を脱イオン水に溶解し，80 °C で 60 分加熱して HA 水溶液を調製した．粉末状の CNH（未酸化：as-CNH，550 °C で酸化：CNH550，575 °C で酸化：CNH575）1 mg を脱イオン水に分散後，HA 水溶液を添加し，振盪しながら 20 分間近赤外光を照射し，混合物を遠心分離して，HA/CNH 複合材料を調製した．次に MC 水溶液を HA/CNH 複合体に加え，振盪しながら 10 分間光照射後，混合物を遠心分離し，MC/HA/CNH 複合体を製作した．形態を観察するため透過型電子顕微鏡（TEM）撮影を行うとともに，MC/HA/CNH に対する光熱効果を検討するため，近赤外光を 10 分間照射し，20 秒ごとに温度測定を行った．各 MC/HA/CNH に担持されている MC 量を，試料調製中に遠心分離によって得られた上清の重量と，MC に特有のピークを示す 350 nm での吸光度を測定することにより計算した．MC/HA/CNH から放出された MC 量は，

MC/HA/CNH 分散液をインサートディッシュに填入し、振盪後、インサートディッシュの外側の溶液の吸光度を測定して計算した。MC が CNH に担持されていることを確認するため、熱重量分析を行った。MC/HA/CNH の凍結乾燥を行い、2 mg のサンプルを室温から 900 °C まで 10 °C/min で昇温し、質量損失を計測した。さらに MC/HA/CNH の殺菌作用とその持続性を評価するため、48 時間透析後のサンプルと透析していないサンプルで細菌培養を行った。*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A.a.)菌懸濁液に MC/HA/CNH 水溶液を添加し光照射後、菌懸濁液を寒天培地に播種し嫌気培養を行い、48 時間後にコロニー数(CFU)計測を行った。また、MC/HA/CNH の細胞毒性を確認するため、マウス線維芽細胞 NIH/3T3 およびマウス骨芽細胞 MC3T3-E1 に MC/HA/CNH 水溶液を添加し光照射し、48 時間培養後の DNA 含有量を測定した。

MC/HA/CNH の TEM 観察の結果、CNH に特徴的な構造が観察され、MC/HA/CNH の調製過程において、CNH の構造が保持されていることが示された。CNH の分散性は CNH575 が最も高く、HA を混合した CNH550 は分散性が向上した。MC/HA/CNH575 に 10 分間近赤外光を照射し温度上昇を測定した結果、溶液の温度は MC 溶液に光照射した場合と比較して 10 °C以上上昇した。さらに CNH575 の温度上昇は CNH550 よりも大きく、光熱効果を利用するには CNH575 が優れていることが明らかとなった。吸光度測定の結果、MC/HA/CNH は MC に特徴的な 350 nm のピークが認められ、熱重量分析では MC 単独のピークと近似した 200 °Cでの質量損失が認められ、MC が HA/CNH に担持されていることが確認された。MC/HA/CNH の薬物放出量を比較したところ、MC/HA/CNH550 は MC/CNH550 よりも多くの MC を放出しており、光照射した場合の MC 量は照射しない場合と比較して 27.6 %高かったことから、CNH に HA を複合化させ、光照射を行うことが薬物放出に有効であると考えた。これらの結果から、細菌培養および細胞培養では MC/HA/CNH575 に焦点を絞った。

MC/HA/CNH の存在下で A.a.菌を 48 時間嫌気培養した結果、細菌生存率は近赤外光照射なしで約 40 %であり、MC/HA/CNH に担持されている MC 濃度と同濃度の MC 溶液 (0.5 mg/mL) の存在下での生存率と同程度だった。一方、MC/HA/CNH の存在下で 10 分間近赤外光照射を行い、A.a.菌を 48 時間培養したところ、細菌生存率は約 0.1 %となり、MC/HA/CNH 作製時に添加した MC と同濃度の MC 溶液 (2.5 mg/mL)での細菌生存率約 1 %よりも減少した。この特性には、HA/CNH の光熱効果が関与していることが推察された。さらに MC/HA/CNH および MC を 48 時間透析後に同条件で実験したところ、MC 溶液 (2.5 mg/mL) の存在下で培養した時の細菌生存率は 90 %と透析前より増加した。一方、MC/HA/CNH の存在下で近赤外光照射後に培養した時の細菌生存率は 0 %となり、統計的有意差を認めた。以上の結果から、MC/HA/CNH の抗菌効果は 48 時間透析後も持続し、光熱活性の能力を維持している可能性があることが確認された。CNH の存在下でマウス線維芽細胞に近赤外光照射を行い 48 時間培養した結果、近赤外光照射の有無および CNH の有無による DNA 量には有意差を認めなかった。また、MC/HA/CNH の存在下で光照射においても、線維芽細胞の DNA 量には、有意差を認めなかった。一方、MC/HA/CNH の存在下で光照射を行ったマウス骨芽細胞の DNA 量はコントロール (生理食塩水) と比較して有意に低かったが、MC のみに暴露された細胞の生存率より高く、統計的有意差を認めた。このため、MC/HA/CNH の細胞毒性は MC 単独よりも低いことが示唆された。

本研究の結果、MC/HA/CNH 複合体は、近赤外光照射によって抗菌効果が増強されることが明らかになった。また、48 時間の透析後も抗菌効果を維持していることが示唆された。この性質を用いて、インプラント周囲炎の治療法への応用が期待される。