

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：37604
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2017～2020
 課題番号：17K11731
 研究課題名(和文) 光硬化型スキャホールドを用いた新しい細胞治療技術の開発と歯科再生医療への展開

研究課題名(英文) Development of new cell therapy technology using photocurable scaffold and development in dental regenerative medicine

研究代表者
 中村 真理子 (Nakamura, Mariko)
 九州保健福祉大学・臨床心理学部・教授

研究者番号：90284067
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は骨や歯周組織の再生に有効な光硬化型スキャホールドを開発することを目的としている。

1.リン酸化した可視光硬化型ゼラチンにpoly(ethylene glycol)diacrylate (PEGDA)を添加し光増感剤としてローズベンガルを使用した結果硬化することが確認された。2.リン酸化した可視光硬化型ゼラチンにS.mutansを播種し、細菌増殖状態について観察を行った。その結果、5日経過した時点でゼラチン上に細菌のコロニーがあることが確認された。3.可視光硬化型ゼラチンに含有されるエンドトキシン量は51.6EU/mLであった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は直接覆髄・断髄、さらには歯髄再生、根尖性歯周炎や歯周病により破壊・吸収された骨や歯周組織の再生に有効な光硬化型スキャホールドを開発することを目的としている。スキャホールドには材料の安定性が求められているが、その一方で創傷治癒までに速やかに消失する必要があるという相反する特性を実現する必要がある。本研究結果より、可視光硬化型ゼラチンをリン酸化したリン酸化ゼラチンはPEGDAを添加することで硬化することが確認された。リン酸化することにより硬組織との接着性が増すことが期待され、従来よりも可視光硬化型ゼラチンの用途が広がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to develop a photocurable scaffold that is effective for the regeneration of bone and periodontal tissue.

1.It was confirmed that poly (ethylene glycol) diacrylate (PEGDA) was added to phosphorylated visible light-curable gelatin and rose bengal were used as photosensitizers, resulting in curing. 2. S.mutans was inoculated on phosphorylated visible light-curable gelatin, and the bacterial growth state was observed. As a result, it was confirmed that there were bacterial colonies on gelatin after five day. 3.The amount of endotoxin contained in visible light-curable gelatin was 51.6 EU / mL.

研究分野：生体材料

キーワード：可視光硬化型ゼラチン ローズベンガル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯髄の失活は『歯牙喪失』への大きな一歩である。歯髄保護の重要性は、歯科医師全てが認識する共通の見解であるが、未だ臨床の場で直接覆髄よりも抜髄を選択する歯科医師が多いのは、直接覆髄材に対する信頼の欠如に他ならない。しかし抜髄後の根管処置も、実に4割が再治療を必要とするとの報告があるなど未だ**確実な歯内療法システムがない**のが現状である。

これまで直接覆髄材には、水酸化カルシウム製剤が長年にわたって臨床の場で多用されてきた。しかし、水酸化カルシウム製剤は、**殺菌性は期待できるものの、接着性がなく封鎖性に問題がある**。この問題を解決すべく、近年では接着性レジンを経直覆髄材として使用する動きも高まっている。しかし、接着性レジン薬理学的効果がなく、臨床では未だ水酸化カルシウム製剤が直接覆髄の主流を為している。研究代表者はこの水酸化カルシウム製剤の欠点を補うべく、硬化して封鎖性を高めた水酸化カルシウム製剤の開発を学位研究として行った。さらに理化学研究所との共同研究で、可視光で硬化するゼラチンを開発した。(Acta Biomaterialia 6: 4005- 4010, 2010)。本材は硬組織と軟組織の両方に接着し、有機溶媒を用いないので、幹細胞や成長因子等の薬剤も患部に担持できる。その成果は Nature Publishing Group の科学雑誌 *Scientific Reports* に掲載された。本研究ではこれらの材料を基に、様々な歯科保存治療に応用できる可視光反応性スキャホールドを開発し、新しい細胞治療法を確立する。

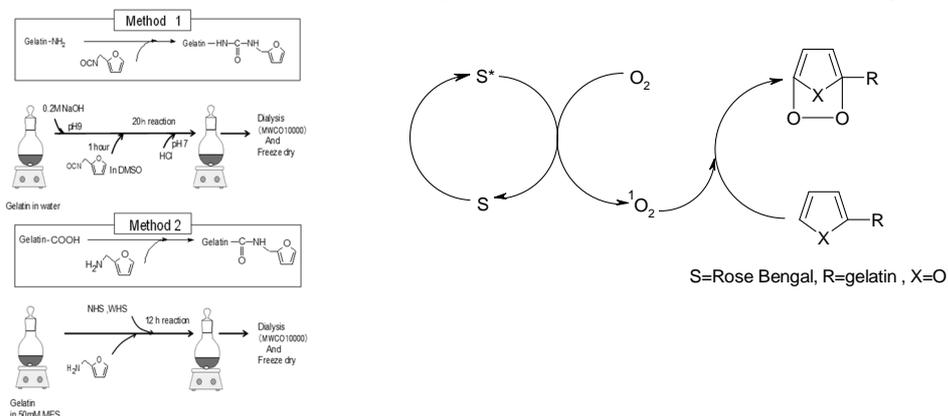
2. 研究の目的

我々は可視光で硬化する光反応性ゼラチンを開発し、細胞治療用のスキャホールドとしての実用化の可能性を検討してきた。さらに、成長因子その他の薬剤のキャリアとしての機能付与に取り組んできた。その結果、新しい再生医療用材料として極めて有用であることが明らかとなり、歯科や医科への幅広い展開が進められている。本研究の目的は歯科での実用化を見据え、覆髄や歯髄再生、根尖性歯周炎や歯周病の周囲組織再生治療など歯科保存治療に幅広く応用できる光硬化型スキャホールドとしての有用性を評価することである。

3. 研究の方法

(1) 材料 可視光硬化型ゼラチンの調整

原料となるゼラチンには、ブタ (Sigma-Aldrich)、サカナ (Sigma-Aldrich)、あるいはヒト (NEO SiLK) 由来物を用いた。下図に示すようにゼラチンのアミノ基にフルフリルイソシアネート (Method 1) を、あるいはゼラチンのカルボキシル基を活性エステル化してフルフリルアミン (Method 2) を反応させ、フルフリル化 (フラン環導入) ゼラチンを合成した。光増感剤としてロ - ズベンガルを混入し、下図右に示すような機構で光架橋によって硬化させた。



また本研究では上記ゼラチンにリン酸基を付与したリン酸化ゼラチンも材料として使用した。

(2) エンドトキシン量の測定

内毒素エンドトキシンの含有量を日本薬局方に準拠して測定を行った。具体的には、WAKO の日本薬局方試薬を用いて、エンドトキシン含有量を測定した。これまで製品として販売されている直接覆髄材や根管充填材は、エンドトキシンに関して特に注意を払って製造されている訳ではないが、炎症を精密にコントロールするためにはエンドトキシンは基準値以下に抑えなければならない。

(3) 歯周組織再生能評価

根管充填材として具備すべき封鎖性と周囲組織再生能を最大限に引き出すため、材料の最適化を行った。以上の結果をもとに、覆髄や歯髄再生、根尖性歯周炎や歯周病の周囲組織再生治療など歯科保存治療に幅広く応用できる光硬化型スキャホールドを開発する。

4. 研究成果

(1) 可視光硬化型ゼラチンの最適化

可視光硬化型ゼラチンにリン酸基を付与したリン酸化ゼラチンを水溶性の二官能性マクロマー（ポリエチレングリコールジアクリレート：PEGDA）光増感剤としてローズベンガルを使用したものを生理食塩水に溶解した溶液を40度の水に温浴させたのち可視光を照射させ硬化させた。なおリン酸化ゼラチンはリン含有率3種類（0.54、0.9、0.98%）を使用した。リン酸化ゼラチン（リン含有率0.54、0.9、0.98%）に可視光を照射したところ、PEGDAを含有しないゼラチンは硬化しなかったが、PEGDAを含有したゼラチンは硬化した。またリン含有率0.9%のものがもっとも硬化することが確認された。

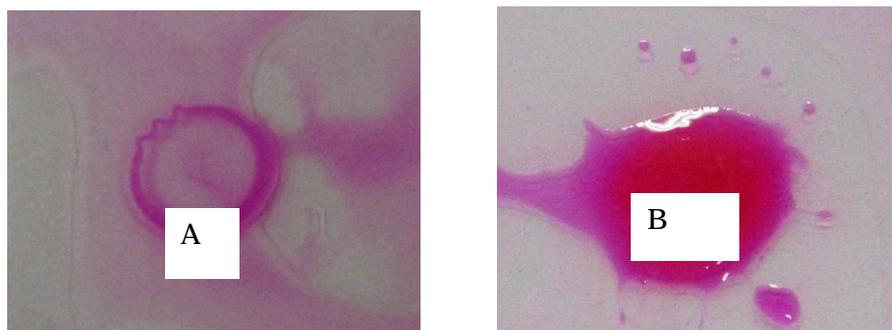


図1 ゼラチンの40度温浴後の写真

A：PEGDA 含有なし

B：PEGDA 含有あり

上記ゼラチンを骨表面に接着させ、人工唾液に浸漬し接着状態について観察を行った。その結果、リン含有率0.9%のリン酸化ゼラチンがもっとも骨と接着することが確認された。

(2) エンドトキシン量の測定

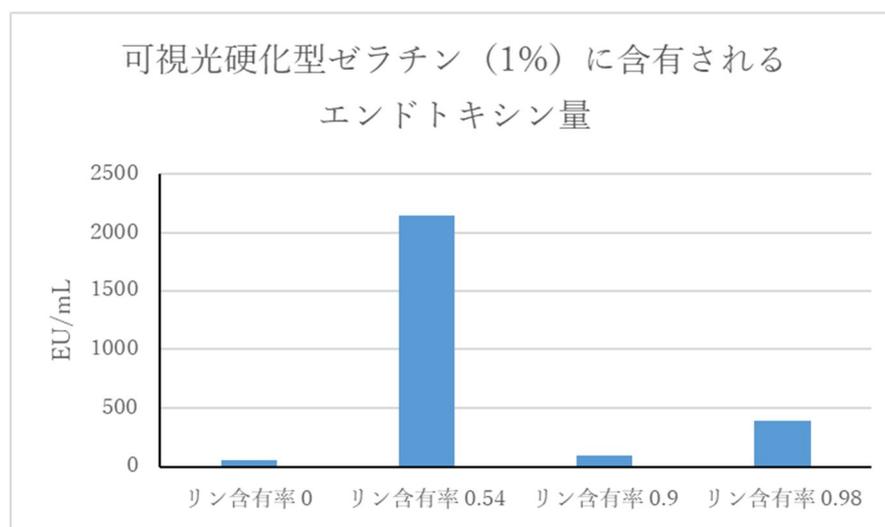


図 2

可視光硬化型ゼラチンに含有されるエンドトキシン量は和光社製トキシノメーターET-6000を使用して測定した。最もエンドトキシン量が少なかったリン酸化率 0 の可視光硬化型ゼラチンに含有されるエンドトキシン量は 51.6EU/mL であった (図 2)。歯科用材料である直接覆髄材や根管充填材は、エンドトキシンに関して特に注意を払って製造されている訳ではないが可視光硬化型ゼラチンを体内で使用する場合にはエンドトキシン規格値にまでエンドトキシン量を減らす必要があると考えられる。エンドトキシン規格値 (EU/mL) = K 値 (EU/Kg) / ヒト最大投与量 (mL/kg) であり、投与経過により K 値 (発熱誘起エンドトキシン量) は異なるがもっとも K 値が大きい静脈内投与でも K 値は 5.0EU/Kg である。そのため体内で使用するためには可視光硬化型ゼラチンに含有されるエンドトキシン量を 1/10 程度減らす必要があることが示唆された。

(3) 生体内での毒性評価

寒天培地上に *S.mutans* を播種し、CO₂ インキュベーター内にて培養を行った。その結果図 3 に示すように 5 日経過後に寒天培地上に *S.mutans* が増殖していることが確認された。この結果、PEGDA を添加したゼラチンも毒性は低いことが確認された。



図 3 A:可視光硬化ゼラチンに PEGDA を添加し *S.mutans* を播種し 5 日経過時。矢印は *S.mutans* のコロニー

B:リン酸化ゼラチン (リン含有率 0.9%) に PEGDA を添加したゼラチン上に *S.mutans* を播種し 5 日経過時。矢印は *S.mutans* のコロニー

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kataoka, T., Abe, S., Tagaya, M.	4. 巻 11
2. 論文標題 Surface-engineered desine of efficient luminescent europium(III) complex-based hydroxyapatite nanocrystals for rapid HeLa cancer cell imaging	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Applied Materials \$ Interfaces	6. 最初と最後の頁 8915-8927
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsami.8b2270.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kim, E-H., Kim, J-W., Han, G-D., Noh, S-H., Choi, J-H., Choi, C., Kim, M-K., Nah, J-W., Kim T-Y., Ito, Y., Son, T-I.	4. 巻 120
2. 論文標題 Biocompatible, drug-loaded anti-adhesion barrier using visible-light curable furfuryl gelatin deviative	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Biological Macromolecules	6. 最初と最後の頁 915-920
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j-ijbiomac.2018.07.180	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamane, K., Mazaki, T., Shiozaki, Y., Yoshida, A., Shinohara, K., Nakamura, M., Yoshida, Y., Di, Z., Kitajima, T., Tanaka, M., Ito, Y., Ozaki, T., Matsukawa, A.	4. 巻 8
2. 論文標題 Collagen-Binding Hepatocyte Growth Factor(HGF) alone or with a Gelatin-furfurylamine Hydrogel Enhanced Functional Recovery in Mice after Spinal Cord Injury	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Report	6. 最初と最後の頁 8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-19316-y	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 -

1. 著者名 Seitoku, E., Era, Y., Nakanishi, K., Bando, Y., Kakuda, S., Nakamura, K., Kusaka, T., Abe, S., Nakamura, M., Yawaka, Y., iida, J., Yoshida, Y., Sano, H.	4. 巻 9
2. 論文標題 Estimation of Controlled Drug-release Behavior of Nano-porous Silica Micro Particles and Their Biocompatibility	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nano Biomedicine	6. 最初と最後の頁 112-116
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11344/nano.9.112	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Era, Y., Seitoku, E., Abe, S., Nakagawa, Y., Hyono, A., Nakamura, M., Yoshida, Y.	4. 巻 1
2. 論文標題 Cytocompatibility of several nano-sized ceramics particles: In vitro study	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Proc. of 17th Chitose Internarional Forum on Photonics Science & Technology	6. 最初と最後の頁 51-54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshizawa, S., Abe, S., Mutoh, M., Kusaka, T., Nakamura, M., Yoshida, Y., Iida, J., Kawabata, H., Tachikawa, H.	4. 巻 58
2. 論文標題 Density Functional Theory Study on Oligosilane-Functionalized C60 Fullerene	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Japanese J. Applied Physics.	6. 最初と最後の頁 0301-0304
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7567/JJAP.56.01AE03	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Era, Y., Seitoku, E., Nakagawa, Y., Bando, Y., Nakanishi, K., Kakuda, S., Hyono, A., Abe, S., Nakamura, M., Inoue, S., Yoshida, Y.	4. 巻 1
2. 論文標題 In vitro study of biocompatubility of several nanoporous ceramics particles used for controlled drug release	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proc. of 18th Chitose International Forum on Photonics Science & Technology	6. 最初と最後の頁 79-82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Era, Y., Seitoku, E., Nakanishi, K., Bando, Y., Nakamura, K., Abe, S., Kusaka, T., Nakamura, M., Inoue, S., Sano, H., Yoshida, Y.	4. 巻 782
2. 論文標題 Controlled drug release property of nano-porous silica micro particles and their cytocompatibility	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Key Engineering Materials	6. 最初と最後の頁 262-267
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4028/www.scientific.net/KEM.782.262	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Seitoku, E., Nakanishi, K., Bandoh, Y., Era, Y., Iwata, S., S. Abe, S., Nakamura, M., Watanabe, Sano, H.
2. 発表標題 Model drug-released behavior from medical materials using nanoporous silica
3. 学会等名 19th Asian BioCeramics Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Era, Y., Farhana, F., Iwata, S., Abe, S., Nakamura, M., Watanabe, I., Yoshida, Y.
2. 発表標題 Drug release behavior from dental/medical materials using nanoporous silica
3. 学会等名 Chitose International Forum 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Era, Y., Seitoku, E., Abe, S., Nakagawa, Y., Hyono, A., Nakamura, M., Yoshida, Y.
2. 発表標題 Cytocompatibility of several nano-sized ceramics particles: In vitro study
3. 学会等名 Chitose International Forum 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔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	伊藤 嘉浩 (Ito Yoshihiro) (40192497)	国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・主任研究員 (82401)	

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	阿部 薫明 (Abe Shigeaki) (40374566)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・准教授 (17301)	

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