

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 3月31日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659357

研究課題名（和文） 組織・生体環境の変化を検出し機能する即応型ターゲティングDDS
への挑戦研究課題名（英文） Targeting DDS with sensing function of tissular and environmental
changes

研究代表者

吉田 靖弘 (YOSHIDA YASUHIRO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：90281162

研究成果の概要（和文）：

天然多糖プルランにリン酸基を導入したリン酸化プルランを合成した。抗菌物質である塩化セチルピリジニウムCPCのみでは10%の高濃度でも洗浄操作によりCPCが流れ去るために十分な抗菌効果が得られなかったが、リン酸化プルランと併用することにより、わずか0.01%で優れた抗菌効果を発揮することが明らかとなった。さらに、リン酸化プルランは抗菌薬や抗がん剤についても徐放制御に役立つことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We synthesized phosphorylated polysaccharides as the carrier for bactericide delivery. It was indicated that 0.01% phosphorylated pullulan and 0.01% cetylpyridinium chloride (CPC) consistently exhibited an antibacterial effect, even after rinsing with distilled water, although CPC at a concentration of 10% showed no effect on bacterial growth after slight rinsing. Furthermore, phosphopullulan exhibited a controllable drug release property for antibacterial and anticancer agents.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	0	1,500,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	2,800,000	390,000	3,190,000

研究分野：生体材料学，歯科理工学，歯科補綴学

科研費の分科・細目：歯学・歯科応用工学・再生歯学

キーワード：DDS，ドラッグデリバリーシステム，キャリア，リン酸化糖，会合，ミセル，臨界，CPC

1. 研究開始当初の背景

がん化学療法や再生医療において、標的臓器の変化に応じ薬物徐放するセンサー機能はDDSの究極の目標である。しかし、現在のDDS

は薬物を一定速度で徐放するのみで、病変を検知して薬物を徐放する機能はない。そこで本研究では、イオン結合と疎水性相互作用で凝集するキャリアと薬物が環境変化に伴い会

合状態を変えることを利用して、標的組織に到達後、組織の変化に反応して瞬時に機能を発現するセンサー機能を有した即応型インテリジェント標的指向性DDSの創製を試みる。

2. 研究の目的

リン酸化多糖を用い、複合コロイド形成機序と機能発現機構を解明することにより、歯や骨を標的としたセンサー機能付DDS創製のための知見を集積する。

3. 研究の方法

(1) 殺菌剤への展開

①混合物の濁り測定

キャリアである多糖誘導体の分子構造が薬剤との会合状態に及ぼす影響を検討するため、リン酸化率や分子量を変えた数種類のリン酸化プルランを合成し、キャリアとして用いた。また、殺菌剤には塩化セチルピリジニウム (CPC) を用いた。PPLとCPCを様々な濃度比で混合した水溶液を調整し、15分間静置後に分光光度計で測定した。

②会合状態の評価

疎水部位と結合することにより青色に呈色するCoomassie Brilliant Blue (CBB) を用いて、PPLとCPCの複合コロイドの会合状態を透過光の吸光度により評価した。

③細菌を用いた抗菌効果の検討

歯面モデルには、アパタイト焼結体 (HAp) を用いた。う蝕原菌 *Streptococcus mutans* の菌懸濁液を12穴プレートに各4 ml分注し、PPLとCPCの混合液で処理したHApを浸漬した。12時間培養後、HAp上に増殖した菌を走査電子顕微鏡にて観察した。

(2) 抗菌薬 (抗生物質) への展開

人工関節置換術等の術後に細菌性深部感染症を引き起こすことがある。その場合、PMMA骨セメントを用いた抗菌剤入りセメントペースト法が広く用いられている。そこで、抗菌薬バンコマイシンを用いて薬物徐放能を検討した。

(3) 抗がん医療への展開

抗がん剤であるメソトレキセートについて、前述の抗菌薬バンコマイシンと同様に試料を作製して徐放量を評価した。

4. 研究成果

(1) 殺菌剤への展開

①混合物の濁り測定

リン酸化プルランとCPCを混合すると、コロイド形成により溶液は白濁した。また、リン酸化プルラン:CPC=1:1(重量比)の混合比の時に白濁は最も顕著であった。一方、1:1の割合で混合した溶液を0~1000 ppmの濃度範囲で濁度を測定すると、濃度低下に伴い濁度も低下するが、100 ppm付近で再び白濁し、再度、コロイドを生成することが明らかとなった。

②会合状態の評価

CBB評価法によって得られたそれぞれのスペクトルのピークトップは、CPCのみのミセルの場合611 nm、PPL:CPCが1:1の複合コロイド1000 ppmの場合612 nm、同じ複合コロイド100ppmの場合629 nmであった。

③細菌を用いた抗菌効果の検討

抗菌物質である塩化セチルピリジニウムCPCのみでは10%の高濃度でも洗浄操作によりCPCが流れ去るために十分な抗菌効果が得られなかったが、リン酸化プルランと併用することにより、わずか0.01%で優れた抗菌効果を発揮することが明らかとなった。また、リン酸化プルラン:CPC=1:1(重量比)の混合比の時は、CPCが100ppmで優れた抗菌効果を発現するものの、リン酸化プルラン:CPC=10:1やリン酸化プルラン:CPC=1:10など混合比が変わった場合は、CPCを含有しているにも関わらず抗菌効果を発現しなかった。

以上の結果より、リン酸化プルランのリン酸化率により殺菌効果やターゲットであるアパタイトへの吸着特性が調節できることが示唆された。さらに、リン酸化プルランのリン酸化率や分子量を最適化することにより、低濃度で著しく抗菌効果を発現するDDSとなることが明らかとなった。

(2) 抗菌薬 (抗生物質) への展開

抗菌薬バンコマイシンを用いて薬物徐放能を検討したところ、リン酸化プルランはPMMAセメントよりも優れた徐放性を示し、より治療効果の高いDDSとなる可能性を得た。

(3) 抗がん医療への展開

メソトレキセートの場合はバンコマイシンとはまったく挙動が異なり、PMMAをキャリア

とした方がリン酸化プルランを用いるよりも早期に徐放することが明らかとなった。さらに、リン酸化プルランのリン酸化率や分子量を変えることにより、徐放速度や徐放量が調節可能であることがわかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計19件)

原著論文15件

- ① Oguri, M., Yoshida, Y., Yoshihara, K., Miyauchi, T., Nakamura, Y., Shimoda, S., Hanabusa, M., Momoi, Y., Van Meerbeek, B. Effect of functional monomer and photo-initiator on the degree of conversion of a dental adhesive. *Acta Biomaterialia* 8:1928-1934, 2012. 査読有
- ② Hirata, I., Yoshida, Y., Nagaoka, N., Hiasa, K., Abe, Y., Maekawa, K., Kuboki, T., Akagawa, Y., Suzuki, K., Van Meerbeek, B., Messersmith, P.B., Okazaki, M. Real-time assessment of surface interactions with titanium passivation layer by surface plasmon resonance. *Acta Biomaterialia* 8:1260-1266, 2012. 査読有
- ③ Yoshihara, K., Yoshida, Y., Hayakawa, S., Nagaoka, N., Irie, M., Ogawa, T., Van Landuyt K.L., Osaka, A., Suzuki, K., Minagi, S., Van Meerbeek, B. Nano-layering of phosphoric-acid ester monomer at enamel and dentin. *Acta Biomaterialia* 7:3187-3195, 2011. 査読有
- ④ Shintaku, Y., Murakami, T., Yanagita, T., Kawanabe, N., Fukunaga, T., Matsuzaki, K., Matsuoka, S., Yoshida, Y., Kamioka, H., Takano-Yamamoto, T., Takada, K., Yamashiro, T. Sox9 expression during fracture repair. *Cells Tissues Organs* 194:38-48, 2011. 査読有
- ⑤ Abe, Y., Hiasa, K., Hirata, I., Okazaki, Y., Nogami, K., Mizumachi, W., Yoshida, Y., Suzuki, K., Okazaki, M., Akagawa, Y. Detection of synthetic RGDS(PO₃H₂)PA peptide adsorption using a titanium surface plasmon resonance (SPR) biosensor. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 22:657-661, 2011. 査読有
- ⑥ Fukuoka, A., Koshiro, K., Inoue, S., Yoshida, Y., Tanaka, T., Ikeda, T., Suzuki, K., Sano, H., Van Meerbeek, B. Hydrolytic stability of one-step self-etch adhesives bonded to dentin. *Journal of Adhesive Dentistry* 13:243-248, 2011. 査読有
- ⑦ Yoshihara, K., Yoshida, Y., Hayakawa, S., Nagaoka, N., Torii, Y., Osaka, A., Suzuki, K., Minagi, S., Van Meerbeek, B., Van Landuyt K.L. Self-etch monomer-calcium salt deposition on dentin. *Journal of Dental Research* 90:602-606, 2011. 査読有
- ⑧ Nikaido, T., Ichikawa, C., Li, N., Takagaki, T., Sadr, A., Yoshida, Y., Suzuki, K., Tagami, J. Effect of functional monomers in all-in-one adhesive systems on formation of enamel/dentin acid-base resistant zone. *Dental Materials Journal* 30:576-582, 2011. 査読有
- ⑨ Mine, A., De Munck, J., Vivan Cardoso, M., Van Landuyt, K.L., Poitevin, A., Kuboki, T., Yoshida, Y., Suzuki, K., Van Meerbeek, B. Enamel-smear compromises bonding by mild self-etch adhesives. *Journal of Dental Research* 89:1505-1509, 2010. 査読有
- ⑩ Abe, Y., Okazaki, Y., Hiasa, K., Hirata, I., Yoshida, Y., Taji, T., Suzuki, K., Okazaki, M., Akagawa, Y. Degree of immobilization of synthetic RGDS(PO₃H₂)PA peptides on titanium surfaces. *Dental Materials Journal* 29:668-672, 2010. 査読有
- ⑪ Kawahara, D., Mine, A., De Munck, J., Kuboki, T., Yoshida, Y., Suzuki, K.,

Van Meerbeek, B., Yatani, H. The quasi-3D marginal leakage of full-coverage crowns: resin coating method versus sodium hypochlorite treatment. *The International Journal of Prosthodontics* 23:406-409, 2010. 査読有

- ⑫ Son, T. I., Sakuragi, M., Takahashi, S., Obuse, S., Kang, J. H., Fujishiro, M., Matsushita, H., Gong, J., Shimizu, S., Tajima, Y., Yoshida, Y., Suzuki, K., Yamamoto, T., Nakamura, M., Ito, Y. Visible light-induced cross-linkable gelatin. *Acta Biomaterialia* 6:4005-4010, 2010. 査読有
- ⑬ Yoshihara, K., Yoshida, Y., Nagaoka, N., Fukegawa, D., Hayakawa, S., Mine, A., Nakamura, M., Minagi, S., Osaka, A., Suzuki, K., Van Meerbeek, B. Nano-controlled molecular interaction at adhesive interfaces for hard-tissue reconstruction. *Acta Biomaterialia* 6:3573-3582, 2010. 査読有
- ⑭ Mine, A., De Munck, J., Van Ende, A., Cardoso, M. V., Kuboki, T., Yoshida, Y., Van Meerbeek, B. TEM characterization of a silorane composite bonded to enamel/dentin. *Dental Materials* 26:524-532, 2010. 査読有
- ⑮ Mine, A., De Munck, J., Van Ende, A., Cardoso, M. V., Kuboki, T., Yoshida, Y., Van Meerbeek, B. TEM characterization of a silorane composite bonded to enamel/dentin. *Dental Materials* 26:524-532, 2010. 査読有

総説 4 件

- ① 吉田靖弘. 生体材料は高齢者の健康維持にどのように貢献できるか. *老年歯科医学* 26:387-393, 2012. 査読無
- ② 吉田靖弘, 沖原 巧, 長岡紀幸, 井上 哲, 鳥井康弘. 誌上フォーラム: 接着試験法. 従来法—引っ張り接着強さと剪断接着強さの測定—. *接着歯学* 29:90-94, 2011. 査読無
- ③ Van Meerbeek, B., Yoshihara, K.,

Yoshida, Y., Mine, A., De Munck, J., Van Landuyt, K. L. State of the art of self-etch adhesives. *Dental Materials* 27:17-28, 2011. 査読無

- ④ 吉田靖弘, 中山陽一, 吉原久美子, 英將生, 峯篤史, 井上哲, 鈴木一臣, Van Meerbeek, B. 歯質接着における化学分析の応用. *接着歯学* 28:1-13, 2010. 査読無

〔学会発表〕 (計 7 件)

- ① 吉田靖弘. 接着技術を活かした生体硬組織の再生・再建. 第 50 回臨床応用を目指した三次元臓器造形研究会. 2012年1月28日. 東京大学医学部附属病院. 東京.
- ② 吉田靖弘. リン酸化プルランを用いた高機能医用材料の開発. 第90回岡山県医用工学研究会・メディカルテクノおかやま平成23年度第2回セミナー. 2011年10月12日. 岡山.
- ③ Yoshida, Y. Phosphopullulan bioadhesive for hard-tissue reconstruction. Start-up Symposium for Innovative Materials Research “A Roadmap for the Future of Oral Biomaterials” July 2nd (Sat), 3rd (Sun), 2011. Osaka, Japan.
- ④ 吉田靖弘. 生体材料は高齢者の健康維持にどのように貢献できるか. 日本老年歯科医学会 第22回学術大会. 教育講演3. 2011年6月16-17日. 東京.
- ⑤ 吉田靖弘. 接着技術の応用による医用材料の高機能化. 日本歯科保存学2010年度会秋季学術大会 (第133回)・第12回日韓歯科保存学会学術大会. シンポジウムⅡ「機能性修復材料開発戦略のベクトルを探る」. 2010年10月28-29日. 岐阜.
- ⑥ 吉田靖弘. リン酸化プルランによる多目的医用材料の開発と製品化への検討. 両備檉園記念財団平成22年度第32回研究助成金贈呈式記念講演. 2010年10月1日. 岡山.
- ⑦ Yoshida, Y., Takahata, T., Nakamura, M., Irie, M., Tanaka, M., Ozaki, T., Suzuki, K., Van Meerbeek, B. Phosphorylated Pullulan Bioadhesive

for Hard-Tissue Reconstruction. 88th General Session & Exhibition of the IADR. Jul 14-17, 2010, Barcelona, Spain.

〔図書〕(計1件)

- ① Van Meerbeek, B., Yoshida, Y. Basics in adhesion technology: In Caries management - Science and Clinical Practice. Chapter 14. pp. 228-245, 2011. 査読無

〔産業財産権〕

○出願状況(計4件)

名称：リン酸化多糖の製造方法
発明者：沖原 巧，亀ノ上翔吾，吉田靖弘，松川昭博，難波尚子，高柴正悟
権利者：岡山大学
種類：特許
番号：特願 2012-73934
出願年月日：2012年3月28日
国内外の別：国内
名称：リン酸化多糖の固相合成方法
発明者：沖原 巧，吉田靖弘，亀ノ上翔吾，井口勉，木島菜摘，難波尚子，長岡紀幸
権利者：岡山大学
種類：特許
番号：特願 2012-73933
出願年月日：2012年3月28日
国内外の別：国内
名称：生体硬組織接着用キット
発明者：吉田靖弘，田中雅人，鈴木一臣，尾崎敏文，高畑智宏，入江正郎，中村真理子，河島光伸，野尻大和，岡田浩一，長尾昌浩
権利者：岡山大学，順正学園
種類：特許
番号：PCT/JP2011/53838
出願年月日：2011年2月22日
国内外の別：国際

名称：虫歯予防剤
発明者：吉田靖弘，高柴正悟，伊東孝，今村幸治，竹内英明，岡本英治
権利者：株式会社グライエンス，岡山大学
種類：特許
番号：特願 2010-105130，特開 2011-246465
出願年月日：2010年4月30日
国内外の別：国内

〔その他〕

受賞(計4件)

- ① 吉田靖弘。(財)医科学応用研究財団平成23年調査研究助成金(2011年)
② 吉田靖弘。第54回日本歯科理工学会学術講演会発表優秀賞(2010年)
③ 吉田靖弘。(財)ホクト生物科学振興財団平成22年度研究奨励金(2010年)
④ 吉田靖弘。(財)両備禮園記念財団平成22年度研究助成金(2010年)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 靖弘 (YOSHIDA YASUHIRO)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：90281162

(2) 研究分担者

沖原 巧 (OKIHARA TAKUMI)
岡山大学・大学院自然科学研究科・講師
研究者番号：70243491
(H22のみ)

長岡 紀幸 (NAGAOKA NORIYUKI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：70304326
(H22のみ)

(3) 連携研究者