

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390434

研究課題名(和文) FGF-2徐放による組織再生誘導能を備えた接着性レジンの開発

研究課題名(英文) Development of adhesive resins with the function to promote tissue regeneration by r
elease of FGF-2

研究代表者

今里 聡 (Imazato, Satoshi)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：80243244

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円、(間接経費) 4,380,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、組織再生促進機能を備えた接着性レジンを実現するための基盤技術として、タンパク徐放用担体としてのpolyHEMA系ハイドロゲル粒子を開発した。そして、この試作ハイドロゲル粒子にFGF-2を担持させたところ、活性を維持した状態でのFGF-2の持続的な溶出が認められ、本粒子がFGF-2の徐放用担体として有用であることが明らかとなった。また、その物理化学的特性の評価に基づき、4-META/MMA系接着性レジンがFGF-2担持ハイドロゲル粒子を適用する基材として適していることが確認された。

研究成果の概要(英文)：Aiming at achievement of adhesive resins with the function to promote tissue regeneration, novel hydrogel as a carrier of protein was fabricated by copolymerization of HEMA and a cross-linking monomer. The experimental poly-HEMA-based hydrogel particle was effective for loading and long-term r
elease of proteins. The analysis of release kinetics and in vitro cell culture studies demonstrated that FGF-2-releasing particle was successfully developed by loading FGF-2 to the experimental poly-HEMA-based hydrogel particle. In addition, 4-META/MMA-based adhesive resins were found to be possibly combined with the FGF-2-releasing hydrogel particle, and the benefits of combination of these two components were suggested.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：歯学 修復材料 レジン 組織再生 接着性 FGF-2

1. 研究開始当初の背景

できる限り歯を抜かずに保存したいという要望の高まりに伴って、かつては抜歯が適応とされてきた歯根破折や穿孔を伴う症例でも、最近では、接着性レジンを用いて封鎖または接着再建を行い、可能な限り保存を試みる頻度が増加している。しかしながら、こういった治療の成功率は必ずしも高いとは言えず、例えば、歯根破折歯を一旦抜去して接着処理後に再植する「接着再建・再植法」での5年生存率は50%に過ぎないことが報告されている。このような保存的治療の失敗の要因の一つには、接着部周囲組織の十分な治癒が得られずに再感染が生じることが挙げられている。したがって、封鎖や再建に使用される材料が、単に確実な接着性を有するだけでなく、組織の再生を促す機能を備えていることが、成功率を向上させる有用な方策の一つであると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、生体組織の再生促進機能を備えた新規の接着性レジンを開発することを最終目標に、4-META/MMA系レジンをFibroblast growth factor-2 (FGF-2)徐放能を付与するための基盤技術の確立を目指した。すなわち、まず、レジン系材料への適用を念頭においた FGF-2 徐放用担体としての polyHEMA 系ハイドロゲル粒子を開発し、FGF-2 担持・徐放特性を評価するとともに、*in vitro*での細胞培養実験により組織再生誘導効果の確認を行なった。さらに、4-META/MMA系接着性レジンへの試作 FGF-2 担持ハイドロゲル粒子の適用方法を、物性や硬化性等への影響の点から検討し、動物実験や臨床試験での有用性評価へと展開できる最終的な材料デザインの確定を目的とした。

3. 研究の方法

(1) タンパク担持用ハイドロゲルの試作と吸水特性の評価

HEMA 100%の重合体あるいは HEMA 90%と架橋性モノマーである TMPT 10%の共重合体を作製し、粉碎して粒子状にした。とくに後者については、粒径の異なる4種の粒子を作製し、重量測定法での吸水性評価に基づいて、以後の実験に最適な材料を選定した。

(2) 試作ハイドロゲル粒子のタンパク担持・徐放能の評価

モデルタンパクとして Bovine serum albumin (BSA, 分子量 6~7 万 kDa) を使用した。BSA 溶液に試作ハイドロゲル粒子を浸漬して担持させた後、37 水中保管し、BSA の放出量を経時的に測定した。また、蛍光ラベルした BSA をハイドロゲル粒子に担

持させ、共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) による観察を行ってタンパクの吸着状態を評価した。

(3) FGF-2 担持ハイドロゲル粒子の調整と FGF-2 徐放挙動の評価

まず FGF-2 試薬 4 種および市販の FGF-2 製剤 (Fiblast) を添加した培地を用いて骨芽細胞様細胞である MC3T3-E1 細胞を培養し、MTT assay と Alkaline phosphatase 活性の測定により細胞の増殖と分化に対する効果を比較した。

上記の実験で最も高い効果を示す FGF-2 を選定し、その水溶液に粒径 550 μm の試作ハイドロゲル粒子を浸漬して、FGF-2 を担持させた。試作した FGF-2 担持ゲル粒子を 37 水中に浸漬し、比色定量法により FGF-2 放出量を経時的に測定した。

(4) 骨芽細胞様細胞に対する増殖促進効果の評価

FGF-2 担持ハイドロゲル粒子を α -MEM 培地に浸漬して 37 保管し、経時的に採取した培地サンプルを用いて MC3T3-E1 細胞を培養した。MTT assay により細胞増殖を評価し、溶出した FGF-2 が活性を維持しているか否かを確認した。

(5) レジンモノマー存在下での FGF-2 の作用発現の確認

未重合モノマーが存在する環境で FGF-2 が効果を発現できるか否かを確認するため、4-META, MMA, または HEMA を添加した培地に FGF-2 を加えて MC3T3-E1 細胞を培養し、MTT assay と Alkaline phosphatase 活性の測定により細胞の増殖と分化を評価した。

(6) 4-META/MMA 系レジンの各種特性および生体親和性の評価

サンメディカル社製 Super Bond をベースに、顔料等を除外した試作の 4-META/MMA 系レジンを開製し、タンパクの活性に影響を及ぼす可能性のある重合熱の発生と未重合モノマーの溶出性について検討した。重合熱の発生による温度上昇は、練和直後のレジン試料に熱電対センサーを挿入し、室温および 37 下で測定した。未重合モノマーの溶出濃度は、レジン硬化体を水中に浸漬し、37 で 24 時間保管後に液体クロマトグラフィーにより測定した。

さらに、調整したレジンの硬化体表面で MC3T3-E1 細胞を培養し、SEM 観察および MTT assay により細胞親和性について検討した。

(7) 試作ハイドロゲル粒子の 4-META/MMA 系レジンへの適用方法の検討

上記で調製した 4-META/MMA 系レジンの粉末に試作ハイドロゲル粒子を種々の濃

度で混合して曲げ強さを測定し、物性への影響を評価した。また、試作ハイドロゲル粒子を練和直後の 4-META/MMA 系レジンに散布する方法での適用の可能性を、硬化性に基づいて検討した。

(8) HEMA 系レジンへの配合の検討

サンメディカル社製 Metaseal Soft をベースにした HEMA を主成分とする基材レジンを調製し、試作ハイドロゲル粒子の混合による硬化性への影響について検討した。

4. 研究成果

(1) タンパク担持用ハイドロゲルの試作と吸水特性の評価

HEMA 100%ポリマーは、吸水すると凝集が生じて粒子状でなくなったが、HEMA 90%/TMPT 10%共重合体は、吸水後も粒子状態を維持し、ハイドロゲル粒子として使用可能であった。

粒径の異なる 4 種の HEMA/TMPT 粒子の吸水率・含水率を測定したところ、いずれの試料間にも差は認められなかった。また、粉碎後 48 時間の蒸留水洗浄を行えば、粒子内に残留した未重合モノマーを減少させることができ、高い細胞親和性が得られることが確認された。

(2) 試作ハイドロゲルのタンパク担持・徐放能の評価

BSA を担持させたハイドロゲル粒子(粒径 550 μm)からは、21 日間にわたる BSA の持続的な溶出が認められた。また、蛍光ラベル BSA を用いた CLSM 観察により、BSA がゲル粒子の表層に密に吸着して担持されていることが分かった。

(3) FGF-2 担持ハイドロゲル粒子の調整と FGF-2 徐放挙動の評価

4 種の FGF-2 試薬および Fiblast の間で、MC3T3-E1 細胞の増殖と分化の点での有効濃度には差が認められなかった。そこで、Fiblast を使用して FGF-2 担持ハイドロゲル粒子を作製し、溶出試験を行った結果、BSA の場合と同様に 21 日までの持続的な FGF-2 の溶出が生じることが確認された。

(4) 骨芽細胞様細胞に対する増殖促進効果の評価

FGF-2 担持ハイドロゲル粒子を浸漬した培地を用いると、MC3T3-E1 細胞の増殖が有意に促進された。また、この増殖促進作用は、14 日間経過後のサンプルでも認められ、ハイドロゲル粒子から溶出した FGF-2 が長期間経過後もその活性を維持していることが確認された。

(5) レジンモノマー存在下での FGF-2 の作用発現の確認

4-META, MMA, HEMA のいずれにおいても、細胞の生存に影響を及ぼさない濃度範囲では、モノマー非添加の場合と同様の FGF-2 の効果発現が認められた。

(6) 接着性レジンの調製と各種特性の評価

4-META/MMA 系レジンの重合時の温度上昇は、室温および 37 $^{\circ}\text{C}$ 下のいずれであっても 2.5 $^{\circ}\text{C}$ 以下であり、タンパクの変性を引き起こすレベルではなかった。また、レジン硬化体からの未重合の 4-META および MMA の溶出濃度は、それぞれ約 2.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約 9.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、先の実験の結果と合わせると、硬化した 4-META/MMA 系レジンから溶出する未重合モノマーは FGF-2 の活性を阻害しないものと考えられた。

一方、4-META/MMA 系レジン硬化体上では、カルチャープレートと同様の MC3T3-E1 細胞の接着・増殖が認められ、FGF-2 徐放性を付与する基材として適していることが分かった。

(7) 試作ハイドロゲル粒子の 4-META/MMA 系レジンへの適用方法の検討

ハイドロゲル粒子の添加濃度の増加に伴って曲げ強さの有意な低下が生じ、物性の観点からは、粉末への直接混合法では 10%以下の配合が望ましいと判断された。また、ゲル粒子を 4-META/MMA 系レジンに散布することで表面に粒子を密に接着させることが可能であることが分かり、物性への影響の点では、粉末への混合よりも有用な方法であるものと考えられた。

(8) HEMA 系レジンへの配合の検討

HEMA を主要組成とするレジンに試作ハイドロゲル粒子を添加すると一体化して硬化してしまい、ゲル粒子が FGF-2 のリザーバーとして十分な役割を果たせない可能性が推測された。

以上のように、本研究により、FGF-2 徐放のための新規の polyHEMA 系ハイドロゲル粒子の開発に成功し、さらに、4-META/MMA 系レジンが試作ハイドロゲル粒子を適用する基材として適していることが判明した。したがって、これらの材料を組み合わせることにより、組織再生促進能を備えた接着性レジンの実現が可能であると結論づけられる。ただし、適用法やハイドロゲル粒子にさらなる改良を施したうえで動物実験に進むことが望ましいと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

(1) Imazato S, Ma S, Chen JH, Xu HH. Therapeutic polymers for dental adhesives: loading resins with bio-active components.

Dent Mater 査読有, 30, 1, 97-104, 2014.
doi: 10.1016/j.dental.2013.06.003.

(2) Ma S, Imazato S, Takahashi Y, Kiba W, Takeda K, Izutani N, Kitagawa H, Chen JH. Mechanism of detoxification of the cationic antibacterial monomer 12-methacryloyloxydodecylpyridinium bromide (MDPB) by N-acetyl cysteine. *Dent Mater* 査読有, 29, 12, 1219-27, 2013.
doi: 10.1016/j.dental.2013.09.008.

(3) Ma S, Imazato S, Chen JH, Mayanagi G, Takahashi N, Ishimoto T, Nakano T. Effects of a coating resin containing S-PRG filler to prevent demineralization of root surfaces. *Dent Mater J* 査読有, 31, 6, 909-15, 2012. doi: 10.4012/dmj.2012-061.

(4) Imazato S. Dental restorative materials in the new era: A shift to restoratives with “bio-protective” & “bio-promoting” effects. *J Osaka Univ Dent Soc* 査読有, 56, 2, 113-8, 2012.

(5) Ma S, Izutani N, Imazato S, Chen JH, Kiba W, Yoshikawa R, Takeda K, Kitagawa H, Ebisu S. Assessment of bactericidal effects of quaternary ammonium-based antibacterial monomers in combination with colloidal platinum nanoparticles. *Dent Mater J* 査読有, 31, 1, 150-6, 2012.
doi: 10.4012/dmj.2011-180.

(6) Kusdemir M, Gunal S, Ozer F, Imazato S, Izutani N, Ebisu S, Blatz MB. Evaluation of cytotoxic effects of six self-etching adhesives with direct and indirect contact tests. *Dent Mater J* 査読有, 30, 6, 799-805, 2011.
doi: 10.4012/dmj.2011-046.

〔学会発表〕(計 19 件)

(1) Takeda K, Imazato S, Kiba W, Ebisu S. Development of 4-META/MMA-based adhesive resin with FGF-2 releasing property - Influences of resin monomers on functions of FGF-2. The International Dental Materials Congress 2011, Seoul, Korea, May 29, 2011.

(2) 今里 聡. これからの歯科用修復材料はどうあるべきか - Bio-mimetic から Bio-protective & Bio-promoting へ - . 大阪大学歯学会第 112 回例会 . 吹田市, 2011 年 6 月 30 日 .

(3) Takeda K, Imazato S, Kiba W, et al. Development of resin adhesive with FGF-2

releasing property. Start-up Symposium for Innovative Materials Research. Suita, Japan, July 3, 2011.

(4) 今里 聡. 歯科用修復材料の高次機能化 - Bio-mimetic から Bio-protective, Bio-promoting へ - . 日本歯科理工学会近畿・中四国支部夏期セミナー . 洲本市, 2011 年 8 月 28 日 .

(5) 竹田かほる, 今里 聡, 恵比須繁之 . 組織再生誘導能を備えた歯科用接着性レジンの開発—タンパク徐放用ハイドロゲルの作製— . 第 33 回日本バイオマテリアル学会大会 . 京都市, 2011 年 11 月 22 日 .

(6) 今里 聡. ”Bio-active”な修復材料による感染制御と組織再生誘導 . 口腔先端応用医学科学研究会第 4 回学術会議 . 東京都, 2012 年 1 月 21 日 .

(7) 竹田かほる, 北川晴朗, 今里 聡. FGF-2 徐放性 polyHEMA ハイドロゲルの開発 - 長期溶出挙動と in vitro での有効性の検討 - . 第 59 回日本歯科理工学会学術講演会 . 徳島市, 2012 年 4 月 14 日 .

(8) 北川晴朗, 竹田かほる, 北川蘭奈, 今里 聡. 抗菌剤の徐放・リチャージに適した polyHEMA 系ハイドロゲルの開発 . 第 59 回日本歯科理工学会学術講演会 . 徳島市, 2012 年 4 月 14 日 .

(9) Imazato S. Restorative materials and technique for future: From Biomimetic to Bio-protective & Bio-promoting. Japan China Dental Conference 2012. Chengdu, China, April 28, 2012.

(10) Imazato S. Restorative materials and technique for the future: From “biomimetic” to “bio-protective & bio-promoting”. Young Scientists in Dentistry 10th Symposium. Leipzig, Germany, October 8, 2012.

(11) Kitagawa H, Imazato S, Hayashi M. Development of rechargeable CPC-loaded hydrogel particles for long-term delivery of antimicrobials. The First Japan-Thailand-Korea Joint Symposium on Translational Research in Oral Sciences. Bangkok, Thailand, November 16, 2012.

(12) 北川晴朗, 今里 聡, 竹田かほる, 北川蘭奈, 三木彩希, 林 美加子 . Poly HEMA/TMPT ハイドロゲルによる cetylpyridinium chloride の長期徐放 . 第 61 回日本歯科理工学会学術講演会 . 東京都, 2013 年 4 月 14 日 .

(13) Imazato S. Cutting edge technology to provide adhesive materials with bio-protective/bio-promoting function. 5th International Congress on Adhesive Dentistry. Philadelphia, USA, June 14, 2013.

(14) Imazato S. Challenges to achieve bio-active adhesives. Joint Symposium for Japanese Society for Adhesive Dentistry and University of Minnesota, St. Paul, USA, June 17, 2013.

(15) Kiba W., Miki S, Imazato S. Effects of ions released from S-PRG filler on osteoblast-like cells. 2nd Meeting of the IADR-Asia Pacific Region, Bangkok, Thailand, Aug 21, 2013.

(16) 今里 聡. 歯科材料の未来. 平成 25 年度日本歯科理工学会近畿・中四国地方会夏期セミナー. 岡山市, 2013 年 9 月 6 日.

(17) Imazato S. Therapeutic polymers: Loading resins with bioactive compounds. ADM Annual Meeting 2013, Vancouver, Canada, Oct 12, 2013.

(18) 今里 聡. これからの歯科用修復材料はどうあるべきか - Bio-mimetic から Bio-protective & Bio-promoting へ -. インターフェイス口腔健康科学第 76 回学術フォーラム. 仙台市, 2013 年 12 月 16 日.

(19) 竹田かほる, 北川晴朗, 林 美加子, 今里 聡. 非生体分解性 FGF-2 徐放ハイドロゲルの *in vitro* での有効性と接着性レジンへの応用に関する検討. 第 63 回日本歯科理工学会学術講演会 東京都, 2014 年 4 月 12 日.

〔産業財産権〕

出願状況 計 1 件

(1) 名称: 歯科用硬化性組成物

発明者: 今里 聡, 竹田かほる, 恵比須繁之, 小里達也, 山本隆司, 岩崎小百合, 宮森沙耶香

番号: 特願 2011-192025

出願年月日: 平成 23 年 9 月 2 日

国内・国外の別: 国内

〔その他〕

大阪大学大学院歯学研究科 顎口腔機能再
建学講座(歯科理工学教室) ホームページ
[http://web.dent.osaka-u.ac.jp/~techno/
welcome.html](http://web.dent.osaka-u.ac.jp/~techno/welcome.html)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

今里 聡 (IMAZATO SATOSHI)

大阪大学・歯学研究科・教授

研究者番号: 8 0 2 4 3 2 4 4

(2) 研究分担者

騎馬 和歌子 (KIBA WAKAKO)

大阪大学・歯学研究科・招聘教員

研究者番号: 1 0 5 2 3 0 8 7

(3) 連携研究者

中野 貴由 (NAKANO TAKAYOSHI)

大阪大学・工学研究科・教授

研究者番号: 3 0 2 4 3 1 8 2