

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：45306

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592822

研究課題名(和文) 直接覆髄・断髄・歯周病治療に応用可能な薬剤徐放型多目的生体接着システムの開発

研究課題名(英文) Development of the multipurpose adhesive system using Drug Delivery for Improved Direct pulp capping, Pulpotomy, and Periodontal treatment

研究代表者

中村 真理子 (Nakamura, Mariko)

吉備国際大学短期大学部・保健科・教授

研究者番号：90284067

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は可視光硬化型ゼラチン，リン酸化プルランにより，多目的生体接着システムを開発することである。本研究結果から以下のことが確認された。すなわちリン酸化プルランは歯質に接着しなおかつ生体親和性の高い材料であること，また可視光硬化型ゼラチンは歯質に接着し，なおかつ細胞毒性が低いことである。このことから可視光硬化型ゼラチンならびにリン酸化プルランは骨ならびに歯に対する生体接着材料として有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to develop a multi-purpose bio-adhesive system by the visible light-induced crosslinkable gelatin and phosphorylated pullulan. The following things were confirmed from these findings. Phosphorylated pullulan-based composite is adhesive to dentin and possesses high biocompatibility. The visible light-induced crosslinkable gelatin is adhesive to dentin and low cellular toxicity. It was suggested that the visible light-induced crosslinkable gelatin and phosphorylated pullulan can be used as key materials of biodegradable adhesives for regeneration and reconstruction of bone and tooth.

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：リン酸化プルラン 可視光硬化型ゼラチン

1. 研究開始当初の背景

歯髓の失活や歯周病による「歯牙喪失」は、「寝たきり」やさらなる「口腔環境悪化」という悪循環につながる。このように歯髓保護の重要性は、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髓よりも抜髓を選択する歯科医師が多いのは、直接覆髓材に対する信頼の欠如に他ならない。しかし抜髓後の根管処置も、3割が再治療を必要とするとの報告もあるなど未だ確立された治療法がないのが現状である。直接覆髓材には、水酸化カルシウム製剤が歯科臨床の場で長年にわたって多用されてきた。しかし、水酸化カルシウム製剤は、強アルカリ性 (pH 11~13) であるために殺菌性は期待できるものの、辺縁漏洩による外来刺激を遮断することはできない。この問題を解決すべく、近年では、接着性レジン直接覆髓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髓の主流を為している。この水酸化カルシウム製剤の欠点を補うべく、我々はアパタイトの析出機構を応用した自己硬化型の水酸化カルシウム製剤を開発した。本材料は硬化することにより歯質との辺縁を封鎖し、かつ、弱アルカリ性 (pH 9~10) に抑えるなど、従来の水酸化カルシウム製剤の欠点を克服している (Nakamura, M. et al., *J Ceram Soc Jpn*, 112:434-439, 2004)。また、我々は理化学研究所と可視光硬化型ゼラチンを共同開発した。本材は硬組織、軟組織を問わず接着し、歯科用レジンのように有機溶媒を用いていないので、成長因子など生体分子の担体にもなりうる (*Acta Biomater.* 6:4005-4010, 2010)。

さらに、歯質接着の研究より得られた知見 (*Acta Biomater.* 6: 3573-3582, 2010) を基に岡山大学との共同研究によりリン酸化プルランを創製した。リン酸化プルランは、リン酸基を導入した多糖誘導體 (特願 2010-036350) で、アパタイト吸着能と成長因子や抗菌物質の徐放能を有しているために、硬組織用ドラッグデリバリーシステムの担体として期待されている。本研究では、これらの生体機能分子を基本材料として、直接覆髓、断髓だけでなく、歯周病やインプラント周囲炎により吸収された骨の再生療法にも応用可能なまったく新しい薬剤徐放型の多目的生体接着システムを開発する。

2. 研究の目的

我々は、あらゆる薬剤の担体となり可視光で硬化する光反応性ゼラチン、人工骨・骨セメントの素材となるアパタイト接着性の多糖誘導體であるリン酸化プルランなど様々な材料の開発に取り組んできた。本研究の目的は、これらの生体機能分子を基本材料として、直接覆髓、断髓に加え、歯周病やインプラント周囲炎により吸収された骨の再生療法にも応用可能なまったく新しい薬剤徐放型の多目的生体接着システムを

開発することである。

3. 研究の方法

(1) 材料

可視光硬化型ゼラチン：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) 由来物を用いる。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) ゼラチンを合成する。光増感剤としてローズベンガルを混入し、下図に示すような機構で光架橋によって硬化させる。

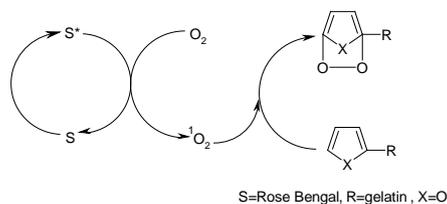


図1 可視光硬化型ゼラチンの硬化メカニズム

リン酸化プルラン：天然多糖類プルランより合成 (特許申請中のため詳細は控える)

(2) 方法

抗生剤、抗炎症剤、成長因子等の薬剤の濃度を変えて可視光硬化型ゼラチンならびにリン酸化プルラン試作セメントに混入し硬化体から溶出する薬剤の量を経時的に分析する。また、各種薬剤を種々の濃度で混入した可視光硬化型ゼラチンならびにリン酸化プルラン硬化体を浸漬した medium で処理した細胞のサイトカイン産生量などから薬剤の徐放効果を検討する。

8週齢雄性ウイスター系ラットに全身麻酔を施した後、上顎第一臼歯近心面にラウンドバー (#1/4) で窩洞形成を行い、短針にて露髓させる。窩洞を洗浄、エア-乾燥した後、薬剤を混入した可視光硬化型ゼラチンならびにリン酸化プルランにて覆髓する。

4. 研究成果

(1) 可視光硬化ゼラチンによる結果

Method1 ならびに Method2 (図2) で作成した可視光硬化型ゼラチンを図3に示すような術式でラット歯髓に添加した。

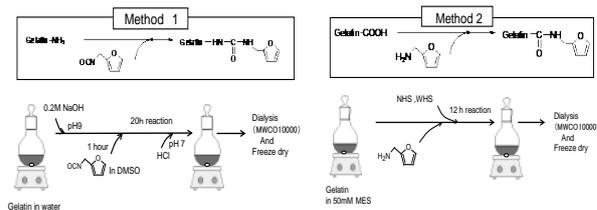


図2 2種類の可視光硬化型ゼラチンの合成法

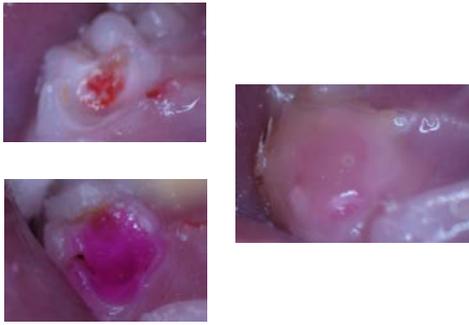


図 3 露髄させたラット上顎臼歯窩洞に可視光硬化型ゼラチンにて覆髄したのち歯科用レジンを充填

図 4 から明らかなように 3 週間経過した時点で Method2 で覆髄した窩洞には歯科用レジが残っていることが確認された。また下段の歯の組織像から明らかなように、Method1 より Method2 で直接覆髄したほうが歯髄の炎症が少ないことも確認された。この結果、Method2 の可視光硬化型ゼラチンは歯への接着性がありまた組織への為害性も少ないことが確認された。

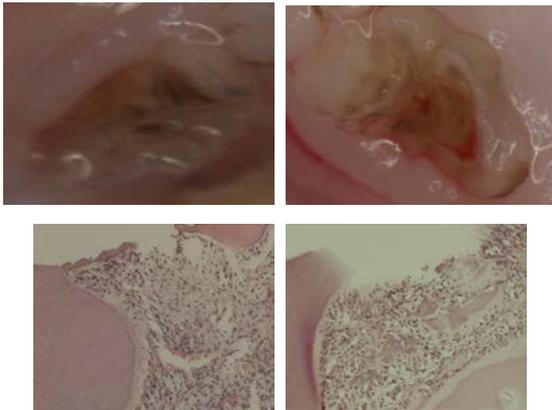


図 4 Method1 (左上) Method2 (右上) にて覆髄したのち 3 週間経過したところ

可視光硬化型ゼラチンのローズベンガルは食紅としても利用されておりその毒性は低いと考えられるが、可視光硬化型ゼラチンを歯周病治療材や軟骨再生材として利用することを考えた場合、毒性を検討することは必要不可欠である。そこで WST-1 アッセイにより、ローズベンガルの細胞毒性の検討を行った。細胞をローズベンガル水溶液存在下ならびに可視光硬化型ゼラチン存在下で 24 時間培養した。生細胞数測定試薬と反応させ 450nm の吸光度を測定した結果、ローズベンガルの濃度が 1 % である場合には可視光硬化型ゼラチンを添加した群の生細胞数の著しい減少が認められた。一方、ローズベンガル水溶液では濃度にかかわらず生細胞数の減少が認められた(図 5)。実験結果から、可

視光硬化型ゼラチンはローズベンガルの濃度が高いと細胞毒性が認められるが、含有される量が 0.5% 以下であれば問題ないことが示唆された。

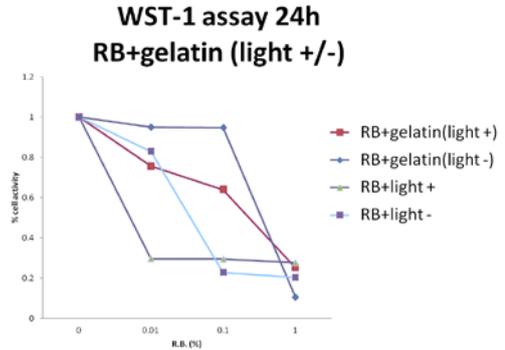


図 5 可視光硬化型ゼラチンによる WST-1 assay の結果

(2) リン酸化プルランによる結果  
リン酸化プルラン、プルランならびにリン酸化プルランとピロリン酸ナトリウム、 $\alpha$ -TCP を混和した粉体から作成した硬化体を水中に浸漬し、硬化体の動態の調査を行った。その結果リン酸化プルランにピロリン酸ナトリウムを添加した硬化体が最も水中で崩壊しにくいことが明らかとなった。

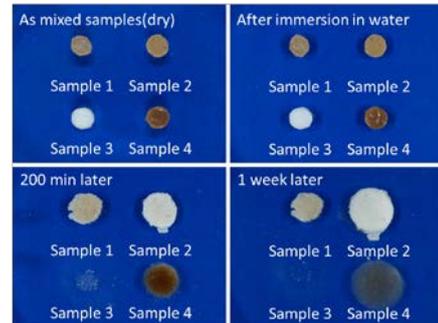


図 6 水中に浸漬した硬化体の動態

サンプル 1 : リン酸化プルラン+ピロリン酸ナトリウム  
サンプル 2 : リン酸化プルラン+ $\alpha$  TCP  
サンプル 3 : プルラン  
サンプル 4 : リン酸化プルラン

次に可視光硬化型ゼラチンと同様にラット歯髄にリン酸化プルランにより直接覆髄を行い 2 週間経過した組織画像を図 7 に示す。



図 7 リン酸化プルランで覆髄後 2 週間経過したところ

図7から明らかなようにリン酸化プルランの硬化体に沿って骨芽細胞が形成されていることが認められた。このことからリン酸化プルラン硬化体は高度な生体親和性を示すことが明らかとなった。

### (3) エンドトキシン量の測定

リン酸化プルランは将来体内埋め込み型の医療用材料を想定しているため、リン酸化プルランに含有されているエンドトキシン量の測定は必要不可欠である。測定装置には和光社製トキシノメーターを使用した。その結果、エンドトキシンの除去を行っていないリン酸化プルランの溶液に含有されるエンドトキシンの量は1%溶液で5EU/mL前後であることが確認された。このことからエンドトキシンの除去操作を行うことによりリン酸化プルランに含有されるエンドトキシンの量はエンドトキシン規格値まで減少できることが可能であることが示唆された。

今回の実験結果から、可視光硬化型ゼラチンならびにリン酸化プルランは歯質に接着しなかつ有害性の少ない材料であることが確認された。さらにリン酸化プルランは生体親和性の高い材料であることが明らかとなった。

## 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 3 件)

- ① Yang, X., Zhu, L., Tada, S., Zhou, D., Kitajima, T., Isoshima, T., Yoshida, Y., Nakamura, M., Yan, W., Ito, Y. Mussel-inspired human gelatin nanocoating for creating biologically adhesive surfaces. *International Journal Nanomedicine* (査読有) 29: 2753-2765. 2014  
DOI: 10.2147/IJN.S60624
- ② Mazaki, T., Shiozaki, Y., Yamane, K., Yoshida, A., Nakamura, M., Yoshida, Y., Zhou, D., Kitajima, T., Tanaka, M., Ito, Y., Ozaki, T., Matsukawa, A. A novel, visible light-induced, rapidly cross-linkable gelatin scaffold for osteochondral tissue engineering. *Scientific Reports* (査読有) 4: 4457. 2014  
DOI: 10.1038/Srep04457
- ③ Shiozaki, Y., Kitajima, T., Mazaki, T., Yoshida, A., Tanaka, M., Umezawa, A., Nakamura, M., Yoshida, Y., Ito, Y., Ozaki, T., Matsukawa, A. Enhanced in vivo osteogenesis by nanocarrier-fused BMP4. *International Journal of Nanomedicine* (査読有) 8:1349-1360. 2013  
DOI: 10.2147/IJN.S44124

### [学会発表] (計 10 件)

- ① 香川洋平、馬崎哲朗、塩崎泰之、山根健太郎、吉田晶、松川昭博、中村真理子、吉田靖弘、北嶋隆、伊藤嘉浩、尾崎敏文 家兎骨軟骨欠損モデルにおける可視光硬化ゼラチンおよび骨髄間質細胞の組織修復効果 第28回日本整形外科学会基礎学術集会 2013年10月17日-18日、千葉
- ② 馬崎哲朗、塩崎泰之、山根健太郎、香川洋平、篠原健介、吉田晶、松川昭博、中村真理子、吉田靖弘、北嶋隆、伊藤嘉浩、尾崎敏文 可視光硬化ゼラチンと collagen binding domain(CBD)-BMP4 の併用による家兎骨軟骨組織修復効果 第28回日本整形外科学会基礎学術集会 2013年10月17日-18日、千葉
- ③ 吉田晶、古松毅之、塩崎泰之、馬崎哲朗、松川昭博、中村真理子、吉田靖弘、北嶋隆、伊藤嘉浩、尾崎敏文 コラーゲン結合性骨形成蛋白質 BMP4 の骨芽細胞に対する影響 第48回日本移植学会総会 2012年9月20日-22日、名古屋
- ④ 塩崎泰之、馬崎哲朗、山根健太郎、吉田靖弘、中村真理子、北嶋隆、伊藤嘉浩、尾崎敏文、松川昭博 マウスを用いた遺伝子改変成長因子 Collagen binding domain BMP4 の効果 第34回日本バイオマテリアル学会大会 2012年11月26日-27日 仙台
- ⑤ 吉田晶、塩崎泰之、馬崎哲朗、古松毅之、松川昭博、中村真理子、吉田靖弘、北嶋隆、伊藤嘉浩、尾崎敏文 ウサギの骨欠損モデルにおいてコラーゲン結合性骨形成蛋白質は骨形成を促進する 第34回日本バイオマテリアル学会大会 2012年11月26日-27日 仙台
- ⑥ 馬崎哲朗、塩崎泰之、吉田晶、松川昭博、中村真理子、吉田靖弘、北嶋隆、伊藤嘉浩、尾崎敏文 家兎骨軟骨欠損モデルにおける可視硬化ゼラチンの骨軟骨組織修復の効果 第34回日本バイオマテリアル学会大会 2012年11月26日-27日 仙台
- ⑦ 吉田晶、馬崎哲朗、塩崎泰之、古松毅之、松川昭博、中村真理子、吉田靖弘、北嶋隆、伊藤嘉浩、尾崎敏文 コラーゲン結合型 BMP4 の骨芽細胞に対する影響 第27回日本整形外科学会基礎学術集会 2012年10月26日-27日 名古屋
- ⑧ 馬崎哲朗、塩崎泰之、吉田晶、松川昭博、中村真理子、吉田靖弘、北嶋隆、伊藤嘉浩、尾崎敏文 ウサギの骨欠損モデルにおけるコラーゲン結合性骨形成蛋白質の有効性 第27回日本整形外科学会基礎学術集会 2012年10月26日-27日 名古屋
- ⑨ Yoshida, Y., Okihara, T., Nakamura, M., Matsumoto, T. Phosphorylated pullulan bioadhesive for regeneration and reconstruction of bone and tooth. *Bioceramics-24* 2012年10月21日-24日 Fukuoka

- ⑩ Nakamura, M., Yoshida, Y., Ito, Y.  
Visible Light-Induced Crosslinkable  
Gelatin for Direct Pulp Capping.  
Bioceramics-24 2012年10月21日-24日  
Fukuoka

[図書] (計 2件)

- ① Nakamura, M., Yoshida, Y., Ito,  
Y. Visible Light-Induced Crosslinkable  
Gelatin for Direct Pulp Capping. Key  
Engineering Materials 529-530:543-546.  
2013
- ② Yoshida, Y., Okihara, T., Nakamura, M.,  
Matsumoto, T. Phosphorylated pullulan  
bioadhesive for regeneration and  
reconstruction of bone and tooth. Key  
Engineering Materials 529-530:516-521.  
2013

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

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：国立大学法人岡山大学，学校法人順  
正学園

種類：特許

番号：特許出願 2013-233269 号

出願年月日：2013年1月11日

国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村 真理子 (Nakamura, Mariko)  
吉備国際大学短期大学部・保健科・教授  
研究者番号：90284067

### (2) 研究分担者

吉田 靖弘 (Yoshida, Yasuhiro)  
北海道大学・大学院・歯学研究科・教授  
研究者番号：90281162

松川 昭博 (Matsukawa, Akihiro)  
岡山大学・大学院・医歯(薬)学総合研究  
科・教授  
研究者番号：90264283

### (3) 連携研究者

伊藤 嘉浩 (Ito, Yoshihiro)  
独立行政法人理化学研究所・伊藤ナノ医工  
学研究室  
研究者番号：40192497