

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462977

研究課題名(和文) 根未完成歯の根尖病巣治療のための成長因子担持-徐放性足場材料の創製

研究課題名(英文) Fabrication of growth factor-sustained release scaffold for treating root apical lesion of root incomplete teeth

研究代表者

至田 宗泰 (SHIDA, Muneyasu)

大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：10187354

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：アパタイトナノ粒子集合体を作製することに成功した。そこで、ナノ粒子集合体と塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)を複合化させ、ラット直接覆髄モデルを用いてその修復象牙質の形成促進効果について病理組織学的に評価を行った。

病理組織学的評価の結果、覆髄1週後で実験群ならびに対照群のいずれもわずかな炎症を認めた。実験群では、覆髄2週後で象牙芽細胞様細胞の層で覆われた修復用象牙質が認められた。bFGFを複合化させた実験群では、覆髄1週後覆髄部分が石灰化する像が確認できた。以上、開発したナノ粒子集合体/bFGF複合体は、象牙質の修復に積極的に関与することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：HAp nanoparticle-assembled powder was applied to exposed dental pulp of rat molars, and the tissue reaction was then examined histologically to assess its biocompatibility and ability to promote hard tissue formation. The pulps of maxillary first molars of male Wistar rats were exposed and then capped directly by using either basic fibroblast growth factors (bFGF)/HAp nanoparticle-assembled powders (experimental group) or only HAp nanoparticle-assembled powders. Histologic examinations showed that there were few inflammatory cells in the pulp near the exposed sites in both groups at 1 week. At 2 weeks, reparative dentin covered with a layer of odontoblast-like cells was observed in the experimental group. bFGF/HAp nanoparticle-assembled powder promoted healing of the dental pulp.

研究分野：歯内治療学

キーワード：成長因子担持-徐放性足場材料

1. 研究開始当初の背景

根末完成歯が歯髄炎もしくは歯髄壊死を起こした場合、従来の治療ではアペキソゲネーシスもしくはアペキシフィケーションを選択する。根部歯髄を保存することができるのであれば歯根の完成を期待しアペキソゲネーシスを行うが、根部歯髄に感染が及んでいるのであればアペキシフィケーションを行う。アペキシフィケーションの術式は、広くあいた根尖孔を硬組織にて閉鎖するため、長期にわたり水酸化カルシウムを根管内に貼薬し、その後根管充填材にて緊密に封鎖する。しかし、近年その考えが変わりつつある。根部歯髄が失活していたとしても、若年者であれば歯髄の再生を期待するというパルプ・リバスキラリゼーションを行う。わずかに残った歯髄組織や Hertwig 上皮鞘の活性を高めて治療を促すという方法である。

Mullane らはスライスした臼歯部歯冠に血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) を作用させてヌードマウスの背中に移植したところ歯髄微小血管密度が非作用群に比較して上昇したことを明らかにした。この結果は VEGF が切断した歯髄の血管新生を高めたと言える (J Dent Res 87; 1144-1148, 2008)。しかし、これら成長因子のドラッグデリバリーによって *in vivo* 根尖性歯周炎モデルを用いて臨床応用を目指すような研究は行なわれていない。

根管内に残存する菌体内毒素 (LPS) は、根尖性歯周炎に伴う根尖周囲骨の骨吸収過程において重要な役割を演じている。水酸化カルシウムの細菌に対する作用として、持続的な消毒作用と並んで、LPS のもつ生物活性を変化させることが報告されている (Safavi et al., J Endod 19:76-78, 1993)。研究代表者は水酸化カルシウムの LPS 生物活性への影響を検討する一環として、LPS 刺激時のヒト歯根膜由来線維芽細胞における 5 種類の炎症性サイトカインの mRNA 発現に対する水酸化カルシウムの影響を RT-PCR 法により検討した。水酸化カルシウムは、LPS による IL-6、IL-8 および TNF- α の遺伝子発現を抑制することが認められた。この結果は、水酸化カルシウムが LPS によって惹起される炎症性反応およびそれに伴う骨吸収を抑制することを示唆している (Shida et al., J Osaka Dent Univ 44(2), 145-150, 2010)。

一方で、アルカリ耐性を示す微生物の存在、側枝、根尖分岐や象牙細管内などの薬効が及びにくい構造の存在、象牙質の緩衝能による殺菌作用の減弱など、水酸化カルシウムによる無菌化獲得に負の影響を及ぼすさまざまな因子が根管内に存在していることもわかっている。そこで、水酸化カルシウム製剤にドラッグデリバリーシステムを応用して成長因子を組織修復の必要時に徐放する全く新しい治療法を考案した。

抗菌剤や成長因子を局所に長期間留ませるための薬物徐放担体としては、注射器で注入可能な微粒子形態であり、治療後の抽出

が不要な生体吸収性材料であることが望ましい。研究分担者は、このような微粒子材料として、生体吸収性縫合糸や骨プレートなどとして臨床実績のあるポリ L 乳酸 (poly(L-lactic acid); PLLA) を選択し、下肢虚血モデルマウスを用いた動物実験においては、微粒子材料を併せて移植することで血管新生療法の治療効果の向上を確認している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、水酸化カルシウム製剤に DDS を応用して血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) を必要時に徐放し、血管新生を促すことで根末完成歯の歯髄疾患や歯周疾患に対する全く新しい治療法を創製することである。

しかし、我々は、水酸化カルシウム製剤より、有効なアパタイトナノ粒子集合体を作製することに成功した。いくつかの細胞を用いて初期細胞接着性を評価したところ、骨芽細胞様細胞のアパタイトナノ粒子集合体に対する細胞接着性は、従来のアパタイト緻密体に比較して有意に高いことを証明した。そこで、ナノ粒子集合体と塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) を複合化させ、ラット直接覆髄モデルを用いてその修復象牙質の形成促進効果について病理組織学および X 線学的に評価を行う。

3. 研究の方法

(1) ナノ粒子集合体の組成および構造制御：

カルシウム塩を溶解した水溶液とリン酸塩水溶液を用いた湿式法によって、アパタイトナノ粒子を作製した。この際、反応温度を変化させることで、アパタイトナノ粒子の組成および形態の制御を試みた。作製したナノ粒子の形態および粒子径は走査型電子顕微鏡 (SEM) によって観察・測定し、X 線回折法 (XRD) によってその結晶構造を同定した。また、フーリエ変換赤外分光光度計 (FT-IR) および X 線光電子分光法 (XPS) を用いてアパタイトナノ粒子の化学組成を求めた。

次に、作製したナノ粒子分散液を乾燥させることで、多孔質体を作製した。得られたナノ粒子集合体の表面および断面の形態は走査型電子顕微鏡によって観察した。また、水銀圧入法によってナノ多孔質構造 (孔径および気孔率) の解析を行った。

(2) ナノ粒子集合体/bFGF 複合体の作製

ナノ粒子集合体/bFGF 複合体は、ナノ粒子集合体にフィブラスプレー (1 mg/mL) 溶液に 24 時間浸漬し、作製した。得られたナノ粒子集合体/bFGF 複合体は、XPS を用いて C の存在から bFGF の存在を確認した。

(3) 直接覆髄モデルラットを用いた修復象牙質の形成促進効果評価

ラットの下顎臼歯部に露髄部を形成し、既

報告の方法に従い直接覆髄モデルラットを作製する。具体的には、全身麻酔を施した Wistar 系ラットの窩洞形成を行い、上顎第一臼歯にナノ粒子集合体/bFGF 複合体を移植する。また、反対側の第一臼歯は、ナノ粒子集合体のみを移植し対照群とする。咬合による影響を避けるため対合歯を抜去する。7, 14 日後にラットを屠殺し、上顎骨ごと被験歯を取り出し通法に従って固定・脱灰後、パラフィン連続切片を調製したヘマトキシリン・エオジン二重 (HE) 染色を施し、光学顕微鏡により歯髄の炎症性変化ならびに修復性変化を病理組織学的に検討する。また、形成された修復象牙質の質についてはマイクロ CT による X 線学的評価を行う。

4. 研究成果

(1) アパタイトの組成および構造制御：

カルシウム塩を溶解した水溶液とリン酸塩水溶液を用いた湿式法を行った結果、温度を低下させることで、粒子径を減少させることができ、薬物担体として有用であると考えられる比表面積を向上させることができた。また、マグネシウム塩を加えた湿式法を行うことで結晶性の低下が確認された。アパタイトの結晶性はその溶解性と関連していることが報告されており、結晶性の制御によって成長因子の放出挙動を制御できる可能性が示唆された。ただし、マグネシウム塩の添加量が多い場合、アパタイトではなく非晶質なリン酸カルシウムとなることが確認された。また、今回作製したアパタイトナノ粒子の表面組成は Ca/P 原子比 = 1.45 であり、カルシウム欠損であることが確認された。カルシウム欠損度により表面のリン酸はプロトン化されており、成長因子の担持・徐放性に影響を与えるものと考えられる。カルシウム欠損度は、アパタイトを作製後にカルシウムイオンを含む塩基性水溶液で処理することで制御可能であることも確認した。

作製したアパタイトナノ粒子を用いて多孔質体を作製したところ、平均細孔径は 8nm であり、気孔率は 57 vol% であった。この際、作製する温度や濃度によって細孔径や気孔率に大きな変化はなく、アパタイトの組成（表面電荷による液中分散安定性）によって変化することが確認された。すなわち、表面電荷を増加させて分散安定性を向上させた場合、乾燥にともなうナノ粒子の蓄積が密になることで細孔径および気孔率が低下することが明らかとなった。また、作製した多孔質体を生体吸収性高分子が溶解された有機溶媒に浸漬・乾燥させることで、内部の気孔構造を保ったまま表面に生体吸収性高分子をコーティングすることが可能であった。この際のコーティング層の厚さは、生体吸収性高分子の濃度によって変化することが確認された。

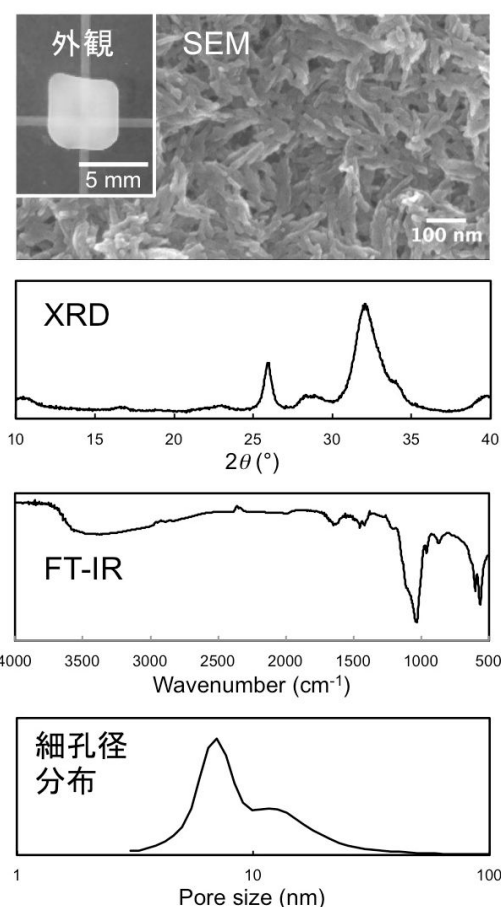


図 1. 薬物徐放担体として用いたアパタイトの外観、走査型電子顕微鏡 (SEM) 写真、X 線回折 (XRD) パターン、フーリエ変換赤外分光 (FT-IR) スペクトル、および細孔径分布

(2) 直接覆髄モデルラットを用いた修復象牙質の形成促進効果評価

HE 染色の結果、覆髄 1 週後で実験群ならびに対照群のいずれもわずかな炎症を認められた。実験群では、覆髄 2 週後で象牙芽細胞様細胞の層で覆われた修復用象牙質が認められた。bFGF を複合化させた実験群では、覆髄 1 週後覆髄部分が石灰化する像が確認できた。

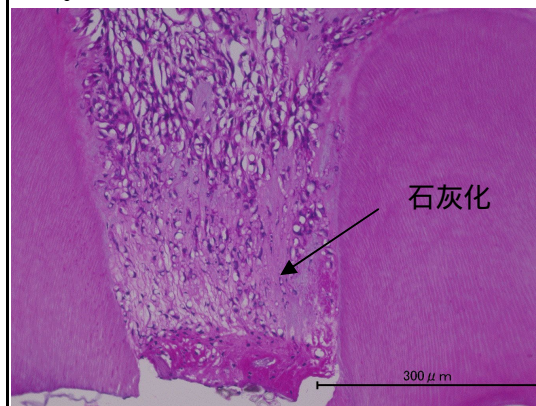


図 2. HE 染色による bFGF 複合材料のラット歯髄組織の変化

以上、開発したナノ粒子集合体/bFGF 複合体は、象牙質の修復に積極的に関与す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1件)

Okada M and T Matsumoto. Synthesis and modification of apatite nanoparticles for use in dental and medical applications. Japanese Dental Science Review. 51(4) 85-95 (2015) (査読有り).

〔学会発表〕(計4件)

岡田正弘, 橋本典也, 馬場俊輔, 至田宗泰, 松本卓也. ナノポーラスアパタイトの孔径によるタンパク質放出挙動の制御. 第36回日本バイオマテリアル学会大会(タワーホール船堀, 東京) 2014年11月18日

岡田正弘. リン酸カルシウムナノ構造体の合成と応用. 第35回岡山歯学会学術集会(岡山大学, 岡山県, 岡山市) 2014年10月26日

徳田知子, 本田義知, 橋本典也, 上村直也, 柿木佐知朗, 山岡哲二, 馬場俊輔, 松本尚之. リン酸カルシウム系骨補填材の骨形性能向上を目指した増殖因子捕捉技術の開発. 第8回ナノバイオメディカル学会(ホテルグランピア和歌山, 和歌山県, 和歌山市) 2014年05月02日

徳田知子, 本田義知, 橋本典也, 上村直也, 柿木佐知朗, 山岡哲二, 馬場俊輔, 松本尚之. 骨組織再生をめざした増殖因子捕捉技術の開発. 第13回日本再生医療学会総会(京都国際会議場, 京都府, 京都市) 2014年03月05日

〔図書〕(計1件)

馬場俊輔, 橋本典也, 笠原真二郎他. 医療用バイオマテリアルの研究開発. シーエムシー出版 2017年 258(73-81)

6. 研究組織

(1)研究代表者

至田 宗泰 (SHIDA, Muneyasu)
大阪歯科大学・歯学部・講師
研究者番号: 10187354

(2)研究分担者

馬場 俊輔 (BABA, Shunsuke)
大阪歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 40275227

橋本 典也 (HASHIMOTO, Yoshiya)
大阪歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号: 20228430

岡田 正弘 (OKADA, Masahiro)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号: 70416220

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし