

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：37604

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462907

研究課題名(和文) 抗菌効果を有し硬組織の再生を促進する歯内療法用材料の実用化

研究課題名(英文) Practical use of materials for endodontic treatment to promote the reproduction of the hard tissue having an antibacterial effect

研究代表者

中村 真理子 (Nakamura, Mariko)

九州保健福祉大学・保健科学部・教授

研究者番号：90284067

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：リン酸化プルランの機械的強さならびにアパタイトとチタンへの接着強さはリン酸カルシウムセメントよりも有意に大きいという結果が得られた。またリン酸化プルランに処理を加えることにより含有されるエンドトキシン量を微量にすることが可能となった。この結果リン酸化プルランは根管充填材として適切な性質を有していることが明らかとなった。  
可視光硬化型ゼラチンはローズベンガル以外の光増感剤でも硬化することが確認されたためより毒性の少ない材料として広範囲に使用できることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：It was provided that the compressive strength of phosphorylated-pullulan (PPL) was higher than  $\alpha$ -tricalcium phosphate cement (TCP) and the shear bond strength to apatite and titanium of PPL was higher than TCP. And we removed endotoxins from PPL. It was appeared that PPL was appropriate as root canal filling materials.  
A novel photo-cross-linkable gelatin (gelatin-FA) was rapidly cross-linked by visible light with Rose Bengal, a light sensitizer. It was confirmed that gelatin-FA was cross-linked with another materials, a light sensitizer. It was suggested to be the materials which we could use as toxic few materials widely.

研究分野：生体材料学

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、3割が再治療を必要とするとの報告も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歯科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、接着性レジン直接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。この水酸化カルシウム製剤の欠点を補うべく、報告者は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。(Nakamura, M. et al., *J Ceram Soc Jpn*, 112:434-439, 2004)。また、歯質接着の研究より得られた知見 (*Acta Biomater.* 6: 3573-3582, 2010) を基に、産学連携によりリン酸化プルラン (特願 2010-036350) 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体で、骨への高い接着性と生体吸収性を有し、従来の材料では治療困難であった水平性骨吸収をも改善する。さらに報告者は理化学研究所の客員研究員として、同研究所と可視光硬化型ゼラチンを開発した。本材は硬組織と軟組織の両方に接着し、歯科用レジンのように有機溶媒を用いていないので、幹細胞や成長因子等の薬剤も患部に担持できる (*Acta Biomater.* 6:4005-4010, 2010)。本研究はこれらの材料を基に、感染を防御し、硬組織を再生するまったく新しい薬剤徐放型歯内療法システムを開発し、臨床応用に必要な知見を集積する。

### 2. 研究の目的

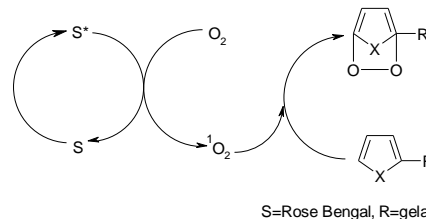
本研究では、幹細胞や薬剤を担持して可視光で硬化する光反応性ゼラチンや多糖誘導体リン酸化プルランを用いた口腔ケア用品、接着性人工骨など様々な材料を開発・実用化してきたこれまでのノウハウを基に、感染を防御し、硬組織を再生する従来にない薬剤徐放型歯内療法システムを開発し実用化につなげることを目的としている。

### 3. 研究の方法

#### (1) 材料の調整および最適化

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, 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。



リン酸化プルランを含有した直接覆髄剤・根管充填剤の調整：リン酸化プルランに関しては、報告者らが開発した合成法を基に、長瀬産業(株)のグループ企業であるナガセケムテック(株)とナガセ医薬品(株)が医薬品レベルで製造 (特許出願中のため合成法の詳細は割愛)。それをキーマテリアルとして材料調整を行う。

エンドトキシン量測定：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する。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する。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。

#### (2) 根管充填材としての機能評価

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う。

#### (3) 直接覆髄材としての機能評価

細胞実験による薬剤徐放能評価：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  
実験動物による直接覆髄としての機能評価

### 4. 研究成果

#### (1) リン酸化プルランによる結果

**圧縮強さ**：市販のリン酸カルシウムセメント (CPC: 商品名バイオベックス R)、リン酸化プルラン (PP) ならびにリン酸化プルランに  $\beta$  TCP を添加したセメントの圧縮強さの計測を行った。モールドは 37°C 恒温槽内で 1 週間保管後万能試験機を用いて、クロスヘッドスピード 0.5mm/min で圧縮強さを測定した。統計処理は student t test にて、CPC セメントとの有意差を検定した。

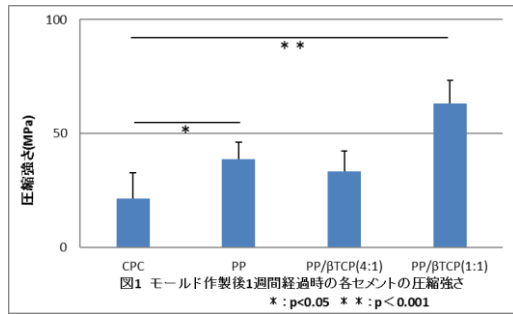
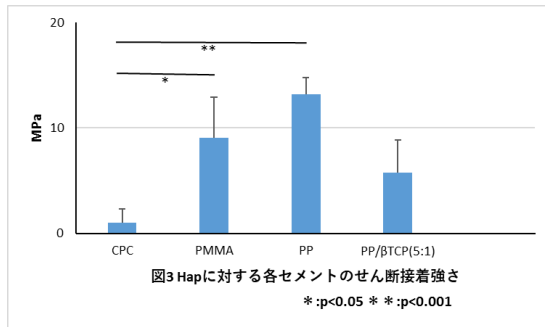
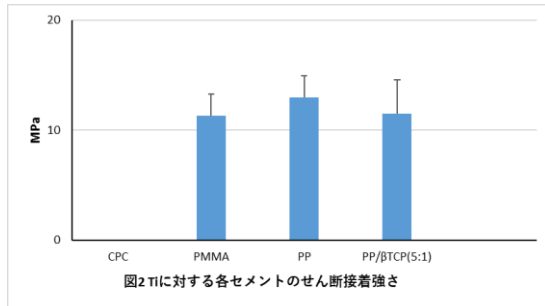


図1にモールド作製1週間後の圧縮強さの結果を示す。CPCセメントとリン酸化プルランならびにリン酸化プルランにβTCPを1:1で添加したセメントとの間には有意差が認められた。

**せん断強さ：**チタンならびにアパタイトとの各セメントの接着強さの測定を行った。図2ならびに図3に試料作製後1日経過時の各セメントのチタンならびにアパタイトに対する接着強さを示す。



チタンに対するCPCセメントの接着力はほとんど認められなかった。PMMA系セメント、リン酸化プルラン、リン酸化プルランにβTCPを添加したセメントではいずれも10MPa以上の接着力が認められた。アパタイトに対する接着力はCPCセメントとPMMA系セメント、リン酸化プルランセメントの間には有意差が認められた。アパタイトとの接着力はPMMAよりもリン酸化プルランセメントは高い接着力を得ることができた。図4はリン酸化プルランセメントの実際の計測したモールドであるが、図に示すようにアパタイトプレートが破折するほど強い接着力を示す結果を得ることもできた。



図4

**エンドトキシン測定：**エンドトキシン測定には日本薬局方に準拠した試験法であるWAKO社製トキシノメーターET-6000を使用した。エンドトキシンは耐熱性があり、不活化するためには250°以上で30分以上乾熱処理する必要があるとされている。今回3種類のリン酸化プルラン溶液をアルカリ処理した結果図5に示すようにエンドトキシン量の減少が認められた。

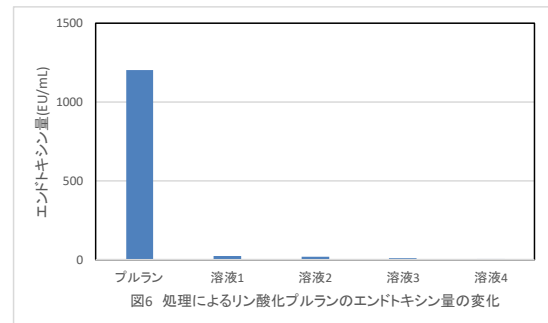
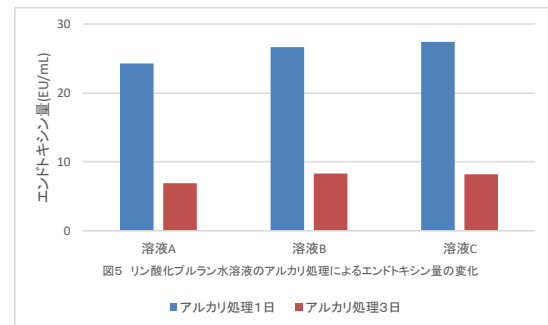


図6に示すように処置を行ったリン酸化プルラン溶液(3%)のエンドトキシン量は未処置のプルランと比較して減少していることが明らかとなった(特許出願中のため合成法の詳細は割愛)。

(2) 可視光硬化ゼラチンの結果  
可視光硬化ゼラチンはローズベンガルを光増感剤として使用しているが、ローズベンガルには少量ではあるが毒性があることが問題となってきた。今回の実験から図7に示すようにローズベンガル以外の物質によってゼラチンが硬化することが確認された(特許出願予定のため物質名は割愛)。



図 7

本研究結果からリン酸化プルランはチタンならびにアパタイトと接着性があり、なおかつある程度の強度も有しており、またエンドトキシンも除去できることが確認された。この結果、リン酸化プルランは歯内充填材料として適していることが明らかとなった。可視光硬化型ゼラチンはローズベンガル以外の光増感剤により硬化することが確認された。

#### 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 8 件)

- ① S. Yoshizawa, S. Abe, M. Mutoh, T. Kusaka, M. Nakamura, Y. Yoshida, J. Iida, H. Kawabata, H. Tachikawa. Density Functional Theory (DFT) Study on Oligosilane-Functionalized C<sub>60</sub> Fullerene *Japanese Journal of Applied Physics*, 56, 01AE0301-04 2017. 査読有 DOI: org/10.7567/JJAP.5601AE03
- ② S. Abe, S. Kawano, Y. Toida, M. Nakamura, S. Inoue, Y. Yoshida, H. Sano, H. Kawabata, H. Tachikawa. Electronic States of Alkyl Radical-Functionalized C<sub>20</sub> Fullerene: Density Functional Theory (DFT) Study *Japanese Journal Applied Physics.*, 55, p03DD0301-04 2016. 査読有 DOI: 10.7567/JJAP.55.03DD03
- ③ M. Mutoh, S. Abe, T. Kusaka, M. Nakamura, Y. Yoshida, J. Iida, H. Tachikawa Density Functional Theory (DFT) Study on Ternary Interaction System of Fluorinated Ethylene Carbonate, Li<sup>+</sup>, and Graphene Model *ATOMS*, 4, 401-408 2016. 査読有 DOI: 10.3390/atoms4010004
- ④ S. Tsuchiya, S. Abe, Y. Era, Y. Nakagawa, M. Nakamura, T. Kusaka, Y. Yoshida, T. Yonezawa, J. Iida. Assessment of size and morphological effects of ceramics nanoparticles on their biocompatibility. *Nanoscience and Nanotechnology Letters*, 8, 329-334. 2016. 査読有 DOI: org/10.1166/nnl.2016.2139
- ⑤ E. Seitoku, S. Abe, T. Kusaka, M. Nakamura, S. Inoue, Y. Yoshida, H. Sano. Cytocompatibility of HeLa Cells to

Nano-Sized ceramics Particles. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 16, 3373-3377. 2016. 査読有

DOI: org/10.1166/jnn.2016.12309

- ⑥ M. Mutoh, S. Abe, A. Hyono, H. Matsuura, K. Nakanishi, K. Kawai, M. Nakamura, S. Inoue, Y. Yoshida, J. Iida, T. Yonezawa Electroconductive pretreatment of several types of non-conductive wet biological samples for SEM using a room temperature ionic liquid: Simple and rapid conductive preparation. *Nano Biomedicine*, 7, 72-80. 2015. 査読有 DOI: org/10.11344/nano.7.72
  - ⑦ M. Mutoh, S. Abe, K. Nakayama, S. Yoshizawa, M. Nakamura, T. Kusaka, Y. Yoshida J. Iida, T. Takada. Simple size-controlled preparation of micro-/nano-sized fullerene C<sub>60</sub> particles using different chain-length diaminoalkane compounds. *Nano Biomedicine*, 7, 87-92. 2015. 査読有 DOI: org/10.11344/nano.7.87
  - ⑧ T. Takahata, T. Okihara, Y. Yoshida, K. Yoshihara, Y. Shiozaki, Yoshida. A, K. Yamane, N. Watanabe, M. Yoshimura, M. Nakamura, M. Irie, B. Van Meerbeek, M. Tanaka, T. Ozaki T, A. Matsukawa. Bone engineering by phosphorylated-pullulan and  $\beta$ -TCP composite. *Biomedical Materials* 10, 65009, 2015. 査読有 DOI: 10.1088/1748-6041/10/6/065009
- [学会発表] (計 6 件)
- ① Y. Era, S. Abe, Y. Nakagawa, A. Hyono, M. Nakamura, and Y. Yoshida "Cytocompatibility of several nano-sized ceramics particles: In vitro study" The 17<sup>th</sup> Chitose International Forum on Photonics Science and Technology, Chitose, Nov. 14-15, 2016
  - ② Y. Era, S. Abe, Y. Nakagawa, A. Hyono, M. Nakamura, T. Kusaka, and Y. Yoshida "Assessment of the cytocompatibility of ceramic nanoparticles with several types of cells" AsiaNANO 2016, Sapporo, Oct. 10-13, 2016
  - ③ S. Yoshizawa, S. Abe, T. Kusaka, M. Nakamura, Y. Yoshida, J. Iida and H. Tachikawa: "Electronic states of alkyl radical functionalized fullerene (R-C<sub>60</sub>): Density Functional Theory (DFT) study" ISPlasma2016, Nagoya, Mar. 7-9, 2016
  - ④ S. Yoshizawa, S. Abe, M. Yohda, M. Nakatani, A. Nishiyama-Chaya, Y. Fujii,

A. Kusuhara, E. Yamatoya, T. Ishida, T. Akasaka, M. Nakamura, Y. Yoshida, J. Iida, and T. Takada “Biomimetic catalytic macromolecules containing an active reaction center analogue of Carbonic Anhydrase: Application for carbonate ion induced reaction on apatite formation” 1<sup>st</sup> International Symposium of Institute for Catalysis – Global Collaboration in Catalysis Science toward Sustainable, Sapporo, Oct. 14-15, 2015

- ⑤ 馬崎哲朗、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「新しい可視光硬化ゼラチンを用いた家兎骨軟骨欠損モデルにおける組織修復効果」第29回日本整形外科基礎学術集会、鹿児島、2014年10月9日～10月10日
- ⑥ 香川洋平、馬崎哲朗、山根健太郎、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「新規生体材料によるインプラントコーティング技術」第29回日本整形外科基礎学術集会、鹿児島、2014年10月9日～10月10日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村 真理子 (Nakamura, Mariko)  
九州保健福祉大学 保健科学部・教授  
研究者番号：90284067

### (2) 連携研究者

伊藤 嘉浩 (Ito, Yoshihiro)  
国立研究開発法人理化学研究所 創発物性科学研究センター・チームリーダー  
研究者番号：40192497

吉田 靖弘 (Yoshida, Yasuhiro)  
北海道大学大学院歯学研究院 生体材料工学教室・教授  
研究者番号：90281162