

平成22年5月25日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19390505  
 研究課題名（和文） DNA/ポリカチオン複合体を素材にしたインジェクション型スキャフォールド材の開発  
 研究課題名（英文） Development of injectable scaffolds including DNA/polycation complexes  
 研究代表者  
 福島 忠男（FUKUSHIMA TADAO）  
 福岡歯科大学・歯学部・准教授  
 研究者番号：80084250

研究成果の概要（和文）：サケ由来 DNA とポリカチオン（キトサン、ポリアルギニン、ポリヒスチジン、ポリリジン、プロタミン）から DNA/ポリカチオン複合体を合成し、インジェクション型スキャフォールド材の素材としての有効性を検討した。DNA/キトサンおよび DNA/プロタミン複合体が流動性に優れていた。また、炭酸アパタイトを添加しても流動性があり、骨形成能も示したのでインジェクション型スキャフォールド材の素材として有望と考えられた。

研究成果の概要（英文）：The DNA/polycation complexes were prepared by reaction between salmon testis DNA and polycations (Chitosan, poly-L-arginine, poly-L-histidine, poly-L-lysine, and protamine) in order to investigate the potential of the complexes for injectable scaffolds. DNA/chitosan and DNA/protamine complexes were mobile paste. These complexes including carbonate apatite were also mobile paste, and created new bone *in vivo* test. It is expected that DNA/chitosan and DNA/protamine complexes will be useful as biomaterials for injectable scaffolds.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2008年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2009年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：補綴系歯学

キーワード：DNA、ポリカチオン、複合体、スキャフォールド材、インジェクション、再生医療、粘性、多孔質

## 1. 研究開始当初の背景

| 高齢者の増加、外科的技法の向上および歯周

病患者の急増に伴い、適度な生体分解能を有し、遅発炎症や抗原抗体反応が無く、抗菌性を示す歯科用生体材料の開発は急務である。現在、生体分解性生体材料の担体としてコラーゲン、ポリ乳酸、キトサン、アガロースが使用されているが分解速度、遅発炎症、抗原抗体反応、BSE および取り扱いなどに問題がある。最近、アニオン性高分子である DNA がそれらに替わる医療用材料の素材として注目されている。DNA は骨形成に必要なリン酸基を分子内に多数有しており、また、塩基対間に抗生物質や骨形成誘導物質 (b-FGF, BMP, TGF- $\beta$ ) などをインターカレーションやグループバインディングさせ、さらに抗原抗体反応を起こし難いなど、生体材料の素材として極めて魅力ある要素を具備した生体高分子である。しかし、DNA は賦形性に乏しく、水溶性であるために取り扱い方、成型方法、生体内での代謝、拡散速度の調整などに難点があるので単独使用はできない。そこで、DNA のリン酸基にカチオン性人工脂質で修飾したところ水不溶性になり、高次構造を保持したまま有機溶媒可溶性を示した。また、人工脂質修飾 DNA 含有有機溶媒をキャストし溶媒を除去すればフィルム (DNA フィルム) になった。DNA フィルムは生体親和性も良く、細胞毒性も軽微で抗菌性や抗真菌性を示し、生体分解性歯科材料の素材として有望となった。しかし、生体分解速度が速く、スキャフォールド材として応用するには、さらなる改善が不可欠となった。そこで、DNA のリン酸基にキトサンのようなポリカチオン性高分子のアミノ基と反応させて架橋構造にすれば、分解速度は遅くなるものと考え DNA/キトサン複合体を合成した。分解速度は遅くなり、生体親和性はキトサン単独より優れ、細胞毒性もほとんど無かったが架橋構造であるので加工性に難点があったが、DNA/キトサン複合体は水で混合するとペースト状になり、PBS バッファーでリンスすると強く凝集するユニークな性質を見いだした。骨補填材 (アパタイト等) は粉末とブロックがあり、粉末の場合はアテロコラーゲン、コハク酸ナトリウム、コンドロイチン硫酸ナトリウム溶液を利用して流動化させ、ブロックの場合はトレーミングして使用している。しかし、患部への形状付与が十分とは言えず BSE の問題などもあり、バイオセラミックスからなる骨補填材に流動性や賦形性を付与する材料の開発が急務である。

そこで、DNA/キトサン複合体のユニークな性質、すなわち、水と混合するとペースト状になり、PBS バッファーでリンスすると強く凝集する性質は骨補填材の流動性や賦形性を付与するのに最適と考えた。また、キトサン以外のポリカチオン (ポリアルギニン、ポリ

ヒスチジン、ポリリジン、プロタミン) から得られた DNA 複合体も同様の性質を示すものと考え、DNA/ポリカチオン/バイオセラミックス複合体からなる新しいインジェクション型スキャフォールド材の開発に着手することにした。

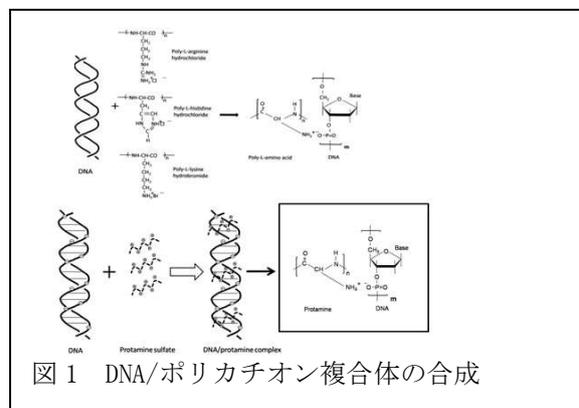
## 2. 研究の目的

DNA/ポリカチオン/バイオセラミックス複合体からなる新しいインジェクション型スキャフォールド材の開発が目的であるので DNA を各種ポリカチオン (キトサン、ポリリジン、ポリアルギニン、ポリヒスチジン、プロタミン) と反応させて複合体を合成する。(1) それら複合体の細胞毒性、動物実験、流動性、加工性などの基礎項目試験から本研究の目的に適した複合体を選択する。(2) 選択された DNA 複合体に炭酸アパタイトを添加して DNA/ポリカチオン/炭酸アパタイト複合体を作製する。(3) 各種複合体の粘度測定、動物実験などから試作インジェクション型スキャフォールド材の有効性を評価する。

## 3. 研究の方法

### (1) DNA/ポリカチオン複合体の合成

図 1 に示した反応式にて合成した。サク由来の DNA (300bp) 100 mg を蒸留水 100 ml に溶解した。この DNA 水溶液を各ポリカチオン (100 mg) 水溶液 (100 ml) に添加し、1 時間反応させた。なお、キトサンは pH 5.0 の水溶液に溶解させて調整した。合成物を遠心分離で回収後、蒸留水で数回洗浄した合成物を凍結乾燥した。



### (2) DNA/ポリカチオン (ポリリジン、ポリアルギニン、ポリヒスチジン、プロタミン) 複合体の細胞毒性

#### ①試料の作製

合成した複合体を液体窒素にて凍結させた後、粉砕した。そして、凍結乾燥して得られた粉を篩にて攪別し、粒径が  $40 \mu\text{m} \sim 100 \mu\text{m}$  の物を細胞毒性試験に使用した。

#### ②DNA/ポリカチオン (ポリリジン、ポリアルギニン、ポリヒスチジン) 複合体の細胞毒性試験

マウス由来の繊維芽細胞 L-929 を使用した。

まず、10%ウシ胎児血清、1%グルタミン、1%非必須アミノ酸を含む $\alpha$ -MEMにて $1 \times 10^4$  cell/mlの細胞浮遊液を作成し、6ウェルマルチプレートの各ウェルに2mlを分注した。培養24時間後、培養液を、試料2mgを含む $\alpha$ -MEM2mlと換えた。その後、37℃、5%炭酸ガス恒温器中にて5日間培養し、MTS法にて細胞生存率を測定した。すなわち、5日培養後、2mlの培養液に対して0.4mlのMTS液を加えて溶液と液交換を行い、2時間培養後492nmの吸光度を測定し、試料未添加の対照群に対する比として百分率で求めた。なお、nは5である。

### ③DNA/プロタミン複合体の細胞毒性試験

マウス由来の骨芽細胞様細胞MC-3T3-E1を使用した。以下は②に従って行ったが試料量は0.5mg/mL~2.0mg/mLとし、プロタミンも測定した。測定はCell Counting Kit-8法で450nmの吸光度を用いた。

(3) DNA/ポリカチオン(キトサン、ポリリシン、ポリアルギニン、ポリヒスチジン、プロタミン)複合体のラット皮下埋入試験

#### ①試料の作成

(1)に従って合成し、水洗した複合体を内径5mm、厚さ1.5mmのテフロンモールドに入れた。両面をテフロン板で挟んだ後に液体窒素に入れて試料を凍結し、凍結乾燥させて直径約5mm、厚さ約1.5mmの円盤状の試料を作成した。なお、試料は電子滅菌を行った。

#### ②動物試験

SPラット(♂、6週)の皮下(背中)を切開し、試料を埋入した。一定期間(3日、10日)後、組織を採取し常法にて固定、染色(HE)した。

(4) DNA/ポリカチオン複合体の流動性の観察と粘度測定

①含水複合体を乳鉢上で練和し、流動性を観察した。

②①で流動性を示した複合体の粘度を回転粘度計あるいはフローテスターにて測定した。

(5) PBS リンスによる加工成形法で作製したDNA/キトサン複合体および炭酸アパタイト含有DNA/キトサン複合体ディスクの動物実験

#### ①試料の作製

凍結乾燥したDNA/キトサン複合体および80%炭酸アパタイト含有DNA/キトサン複合体に蒸留水を加え、乳鉢中で練和して流動性のある混和物を作製した。この混和物を円盤状シリコンモールド(皮下用:内径8mm、厚さ2mm、頭蓋骨用:内径5mm、厚さ1.5mm)に流し込みPBS緩衝液(pH6.0~pH7.8)で洗浄した。その後、凍結乾燥して、多孔質DNA/キトサン複合体を加工成形した。なお、炭酸アパタイト含有DNA/キトサン複合体は風乾させて加工成形した。

### ②DNA/キトサン複合体ディスクのラット皮下埋入試験

SPラット(♂、6週)の皮下(背中)を切開し、試料を埋入した。一定期間(3日、10日、60日、180日)後、組織を採取し常法にて固定、染色(HE)した。

### ③DNA/キトサン複合体ディスクおよび炭酸アパタイト含有DNA/キトサン複合体ディスクのラット頭蓋骨埋入試験

6週齢のラットの頭蓋骨部位に、トレフィンバーにて開口した骨欠損部にディスク状複合体を埋入した。所定期間(7週間、12週間)後、頭蓋骨組織を採取し、常法にて固定、トリジンブルー染色し、鏡検した。

### (6) DNA/プロタミン複合体ペーストの細胞接着試験

ペーストをガラス板に圧接し作製した薄膜を24ウェルマルチプレートに置いた。MC3T3-E1細胞を $1 \times 10^4$  cell/mlに調整し、ウェルに1ml播種し、3時間後の細胞接着状態を顕微鏡で観察した。

### (7) DNA/プロタミン複合体ペーストの抗菌性および動物実験

#### ①試料の作製

ペーストを内径5mm、厚さ1.5mmのシリコンモールドに入れ、ディスク状複合体を形成した。

#### ②抗菌試験

黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)、緑膿菌(*P. aeruginosa*)、歯周病原菌(*P. gingivalis*)および*P. intermedia*を含む液体培地に3枚のディスク状複合体を入れ、菌の増殖を分光光度計による625nmの吸光度から調べた。

#### ③ラット皮下埋入実験

SPラット(♂、6週)の皮下(背中)を切開し、ディスク状複合体を埋入した。一定期間(3日、10日、15日、20日)後、組織を採取し常法にて固定、染色(HE)した。

#### ④ラット頭蓋骨埋入試験

6週齢のラットの頭蓋骨部位に、トレフィンバーにて開口した骨欠損部にディスク状複合体を埋入した。埋入4週間後、頭蓋骨組織を採取し、常法にて固定、トリジンブルー染色し、鏡検した。

## 4. 研究成果

### (1)細胞毒性試験

表1の結果からも明らかなようにDNA/poly-L-histidine以外の細胞毒性は軽微である。注目すべきはDNA/プロタミン複合体の細胞毒性がプロタミン単独より極めて軽微であることである。DNA/キトサン複合体も同じ結果であることはすでに知られており、DNAとの複合化はポリカチオンの細胞毒性を軽減する効果があることを強く示唆できる。

表1 細胞毒性試験

Sample	Cell viability (% of control)
DNA/poly-L-arginine	88.0 ± 16.2
DNA/poly-L-histidine	56.0 ± 8.9
DNA/poly-L-lysine	82.1 ± 11.7

Sample	Cell viability (% of control)		
	0.5 mg/mL	1.0 mg/mL	2.0 mg/mL
DNA/protamine complex	107.6 ± 5.3*	106.0 ± 3.7*	98.5 ± 2.8
Protamine sulfate	76.0 ± 7.4	5.1 ± 0.3	3.8 ± 0.1

Same symbols indicate no statistical difference (p>0.05).

(2) 皮下埋入動物実験

図2に組織写真を示した。埋入3日後：埋入材料は、周囲を細胞成分に富む肉芽組織で取り囲まれて皮下組織に存在し、周囲の正常組織とは完全に分画されていた。肉芽組織は、線維芽細胞および毛細血管の増殖が著明で、少数の炎症細胞も確認された。埋入材料は、断片化され小片（塊）として認められた。小片周囲には、軽度の好中球浸潤がみられ、さらに周囲肉芽組織と埋入材料との境界部には少量の浸出物の析出も認められた。これらの所見は、材料埋入による生体の急性炎症反応（軽度）と考える。また、埋入に伴う感染などの惹起は認めなかった。

埋入10日後：皮下の埋入部は、全て肉芽組織に置換された。多核巨細胞の食食反応による埋入材料の断片化が進み、組織学的には典型的な異物肉芽腫の像を呈している。肉芽組織は、線維化が進んでおり、将来的には埋入材料が消失し、完全な器質化（線維性結合組織に置き換わる）により反応が終了するところが推測された。

組織学的所見：術後3日後および10日後の組織学的観察において、使用した4種類のポリアミノ酸複合体に対する生体反応は、ほぼ同様であった。

(3) DNA/ポリカチオン複合体の流動性の観察と粘度測定

図3にDNA/キトサンおよびDNA/プロタミン複合体ペーストを示した。粘度はそれぞれ約5Pasと254Pasであった。また、DNA/キトサン複合体の場合はPBSリンス処理すれば賦形性が得られ、DNA/プロタミンは処理なしでも加工成形（賦形性）が可能であった。DNA/プロタミン複合体がペーストになることは新たな発見であり、極めてユニークである（特許出願）。ペースト化は利便性に優位であり、この性質の有効性が期待できる。なお、他の複合体は流動性を示さなかったが生体分解能性生体材料の素材として有望であり、用途は今後の課題である。

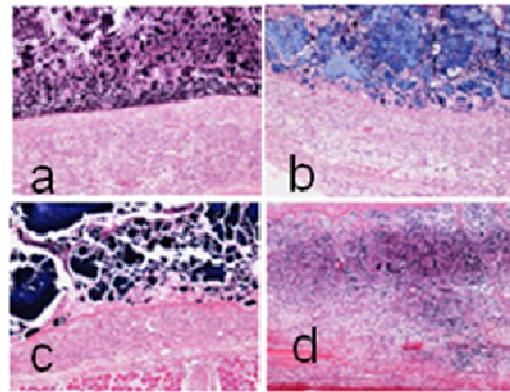


図2 複合体の皮下埋入実験組織写真（上段：術後3日，下段：術後10日，a:DNA/アルギニン，b:DNA/ヒスチジン，c:DNA/リジン，d:DNA/プロタミン



図3 DNA/キトサン(左)およびDNA/プロタミン(右)複合体ペーストとその賦形性

(4) DNA/キトサン複合体および炭酸アパタイト含有DNA/キトサン複合体ディスクの動物実験

①DNA/キトサン複合体ディスクの皮下および頭蓋骨埋入実験：図4に組織写真からも明らかのように試料は正常繊維状組織によるカプセル化され残存していた。残存率はそれぞれ皮下の場合は約60%，頭蓋骨の場合は約80%であった。これはPBS処理より気孔率が

低下, すなわち細胞が侵入できるスペース減少したために分解が抑制されたものと考えられ今後の改善課題となった。

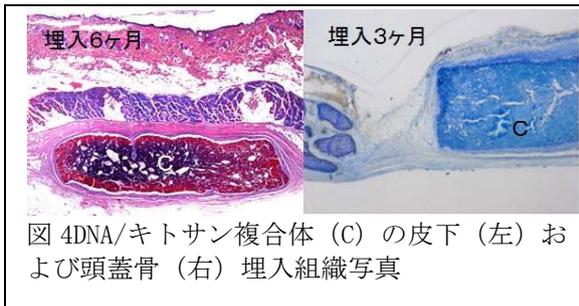


図4 DNA/キトサン複合体 (C) の皮下 (左) および頭蓋骨 (右) 埋入組織写真

②炭酸アパタイト含有 DNA/キトサン複合体ディスクの頭蓋骨埋入実験: 図5から明らかなように埋入7週目に骨様組織が発現し, 埋入12週目に新生骨の形成が認められた. 新生骨形成は炭酸アパタイトの添加効果が大と考えられるが, DNA/キトサン複合体の足場材として機能との相乗効果と推察する. 図5から明らかなように埋入7週目に骨様組織が発現し, 埋入12週目に新生骨の形成が認められた. 新生骨形成は炭酸アパタイトの添加効果が大と考えられるが, DNA/キトサン複合体の足場材としての機能との相乗効果と推察する. すなわち, DNA/キトサン複合体単独とは異なり, 炭酸アパタイトとの複合化によって細胞が侵入しやすい適度なスペースの確保や骨形成に適した分解速度になったことの2点が重要な要素であると考えている. この成果はスキャフォールド材の今後の開発研究の重要な指針となった。

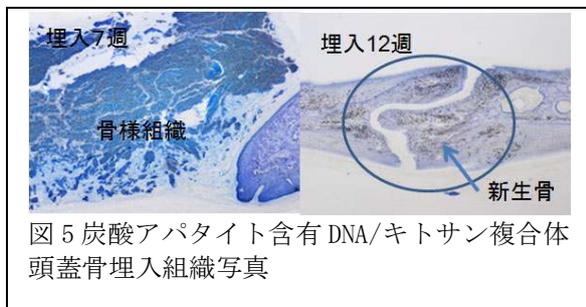


図5 炭酸アパタイト含有 DNA/キトサン複合体頭蓋骨埋入組織写真

(5) DNA/プロタミン複合体ペーストの細胞接着試験, 抗菌性試験および動物実験

①細胞接着: 図6から明らかなようにマルチプレートへの接着よりやや劣っていたが細胞接着は観察できた. 細胞毒性も軽微であるので細胞の分化に与える影響について検討することが今後の課題である。

②抗菌試験: 図7より明らかなように細胞毒性がないにもかかわらず抗菌性を示した. これは術中の細菌感染防止が可能であることを示唆している. 特に, 歯周病菌に有効であり, かつペーストでいかなる形状にも容易成形できるのでGTR膜などの用途に適している. また, 抗菌材の素材としても有望である。

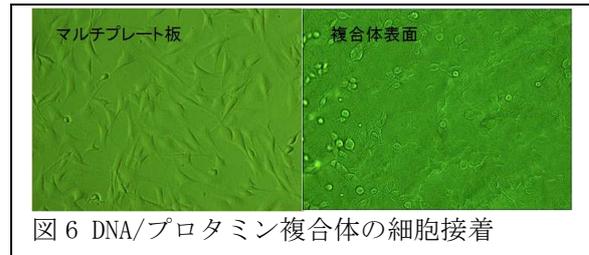


図6 DNA/プロタミン複合体の細胞接着

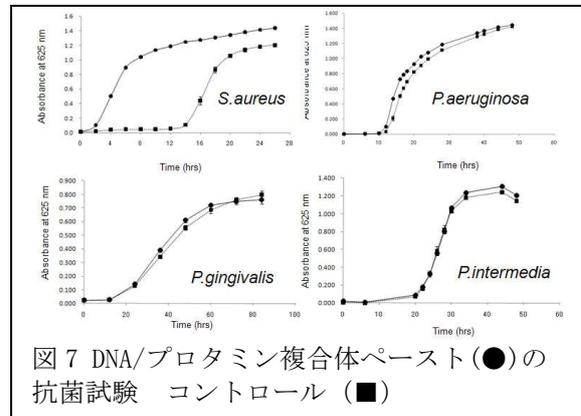


図7 DNA/プロタミン複合体ペースト(●)の抗菌試験 コントロール(■)

③皮下および頭蓋骨埋入実験: 皮下埋入実験は粉末(図2d)と同じ所見であった. 頭蓋骨埋入実験においては図8からも明らかなように骨様組織が頭蓋骨底部に認められた. これはDNA/プロタミン複合体が骨伝導性を有している可能性が高いことを強く示唆した結果であり, 今後研究に期待できる。

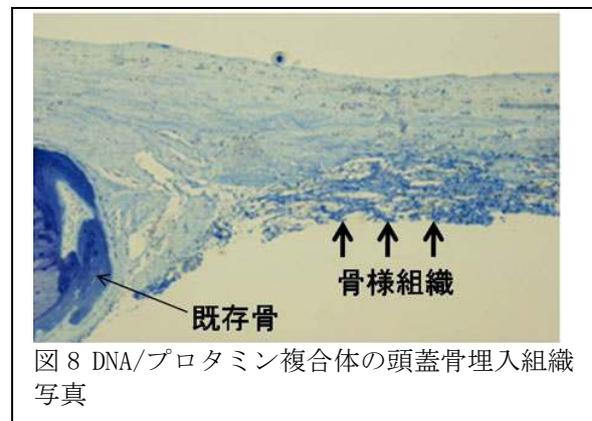


図8 DNA/プロタミン複合体の頭蓋骨埋入組織写真

### 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6件)

① Tadao Fukushima, Jun Ohno, Tohru Hayakawa, Rieko Imayoshi, Minoru Kawaguchi, Yutaka Doi, Keiichi Kanaya, Makoto Mitarai: Polycationic protamine for water-insoluble complex formation with DNA, Dent Mater J, in press. 査読あり

② Minoru Kawaguchi, Jun Ohno, Teruaki Iwahashi, Tadao Fukushima, Tohru Hayakawa, Yutaka Doi: Bone response of

DNA-chitosan-apatite complexes, J Oral Tissue Engin, 7, 89-98, 2009. 査読あり

③ Tadao Fukushima, Jun Ohno, Tohru Hayakawa, Minoru Kawaguchi, Yusuke Inoue, Shoji Takeda, Mika Toyoda, Yoshio Okahata: Mold Fabrication and biological assessment of porous DNA-chitosan complexes, J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater, 91B, 746-754, 2009. 査読あり

④ Tadao Fukushima, Minoru Kawaguchi, Tohru Hayakawa, Jun Ohno, Teruaki Iwahashi, Kuniyoshi Taniguchi, Yusuke Inoue, Shoji Takeda: Complexation of DNA with cationic polyamino acid for Biomaterial purposes, J Oral Tissue Engin, 6, 24-32, 2008. 査読あり

⑤ Tadao Fukushima, Minoru Kawaguchi, Tohru Hayakawa, Shoji Takeda, Yusuke Inoue, Jun Ohno, Kuniyoshi Taniguchi: Drug binding and releasing characteristics of DNA/lipid/PLGA film, Dent Mater J, 26, 854-860, 2007. 査読あり

[学会発表] (計13件)

①福島忠男, 大野 純, 井上勇介, 川口 稔, 早川 徹, 御手洗 誠, 岡畑恵雄: DNA/プロタミン複合体の合成と組織親和性, 第31回日本バイオマテリアル学会大会, 平成21年1月17日, 京都府民総合交流プラザ 京都テルサ (京都市)

②福島忠男: DNA含有ペーストの歯科医療への応用事例, 第9回産学連携フェア, 平成21年10月28日, (財)北九州産業学術推進機構 産学連携C (北九州市)

③福島忠男, 大野 純, 井上勇介, 川口 稔, 早川 徹, 御手洗 誠, 土井 豊: 炭酸アパタイト含有 DNA/プロタミン複合体の流動性と組織親和性, 第54回日本歯科理工学会学術講演会, 平成21年10月1日, かごしま県民交流センター (鹿児島市)

④福島忠男, 大野 純, 井上勇介, 川口 稔, 早川 徹, 御手洗 誠: DNA/プロタミン複合体の合成とその生物学的性質, 第53回日本歯科理工学会学術講演会, 平成21年4月1日, タワーホール船堀 (東京都江戸川区)

[産業財産権]

○出願状況 (計3件)

①名称: 抗菌歯周病剤及びそれを用いた医療用または歯科用材料  
発明者: 福島忠男, 早川徹, 岡畑恵雄, 御手洗誠, 庵原啓司, 江成宏之, 関戸治知

権利者: 福島忠男, (株)マルハニチロ食品

種類: 特許

番号: 2008-324524

出願年月日: 平成20年12月19日

国内外の別: 国内

②名称: 抗菌歯周病剤及びそれを用いた医療用または歯科用材料

発明者: 福島忠男, 早川徹, 岡畑恵雄, 御手洗誠, 庵原啓司, 江成宏之, 関戸治知

権利者: 福島忠男, (株)マルハニチロ食品

種類: PCT出願

番号: PCT/JP2009/071231

出願年月日: 平成21年12月21日

国内外の別: 国外

6. 研究組織

(1)研究代表者

福島 忠男 (FUKUSHIMA TADAO)

福岡歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号: 80084250

(2)研究分担者

井上 勇介 (INOUE YUSUKE)

福岡医療短期大学・歯科衛生学科・准教授

研究者番号: 20105688

(3)研究分担者

早川 徹 (HAYAKAWA TOHRU)

日本大学・松戸歯学部・准教授

研究者番号: 40172994

(4)研究分担者

岡畑 恵雄 (OKAHATA YOSHIO)

東京工業大学・生命理工学・教授

研究者番号: 80038017

(5)研究分担者

土井 豊 (DOI YUTAKA)

朝日大学・歯学部・教授

研究者番号: 40116067

(6)研究分担者

武田 昭二 (TAKEDA SHOJI)

大阪歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号: 20067185

(7)研究分担者

川口 稔 (KAWAGUCHI MINORU)

福岡歯科大学・歯学部・助教

研究者番号: 10122780

(8)研究分担者

大野 純 (OHNO JUN)

福岡歯科大学・歯学部・講師

研究者番号: 10152208

(9)研究分担者

豊田 美香 (TOYODA MIKA)

福岡歯科大学・歯学部・助教

研究者番号: 90412626