

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792290

研究課題名(和文)口腔組織再生誘導のためのDDS徐放性コラーゲンスポンジの調製と機能評価

研究課題名(英文)Preparation and evaluation of drug-releasing collagen substrates for oral guided tissue regeneration.

研究代表者

佐々木 かおり (Sasaki, Kaori)

岩手医科大学・歯学部・助教

研究者番号：00364373

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：コラーゲンスポンジは構造安定化のため化学架橋としてGAを用いることが多いが、残留した未反応のGAの生体為害性が懸念される。そこで本研究では同等の架橋作用が期待されるEDCにて化学架橋を施し、濃度、架橋時間を変化させて架橋状態を比較検討したところ、EDC架橋は有用である結果が得られた。

また、アルギン酸が多価金属と架橋してゲル化する性質に注目し、Ca、Fe架橋にて作製したフィルムから、物理的強度の課題は残るものの、低分子量体で作製されたフィルムの有用性が確認された。適切な分子量の架橋性高分子を選択することにより、フィルム製剤として薬剤徐放スピードの制御が可能になる技術に応用できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Aiming to develop a bioabsorbing scaffold material from type 1 collagen, crosslinked spongy collagen was prepared using either GA or EDC as crosslinker, to which drug-releasing function was expected. Both the concentration of crosslinker and the reaction time were varied to prepare the spongy collagen with different degree of crosslinking. While the crosslinking rate increased with the crosslinker concentration and the reaction time, it was not reflected to the appearance observed by SEM. Since GA is unfavorable to the organ, EDC may be a good alternative as the crosslinker.

Alginate gel was obtained by crosslinking sodium alginate using CaCl<sub>2</sub>. Multiplication of human periodontal ligament fibroblasts (HPdLF) was observed on the prepared alginate gel. Drug-releasing function was investigated by optically monitoring the release of methylene blue as a model drug. These results suggested that alginate gel has an ability of multiplication of cell and drug delivery.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：生体材料 DDS 物性試験 架橋

## 1. 研究開始当初の背景

- (1) 再生医学の研究は急速に進歩しつつあり、歯科分野においても口腔粘膜の再建や歯槽骨の再生など、口腔組織再生の研究が数多く試みられている。コラーゲンスポンジは、口腔組織再生を誘導する生体吸収性足場材料の中で細胞が増殖・分化するのに適した材料として注目されている。

研究開始当初、市販のⅠ型コラーゲン溶液を用いたコラーゲンスポンジの作製を行っていたが、物理的強度に乏しく、生体内で分解が早いなどの問題点があり、足場として、あるいは DDS として不十分な要素を抱えていた。

- (2) また、再生医療で使用されるフィルム材料には、生体適合性に優れるほかにそれ自体が細胞接着を促進させるような生理活性機能と、薬剤を徐放する機能の双方が求められる。生体親和材料であるアルギン酸は、金属イオンを取り込むと錯体を形成するが、その性質は金属イオンの種類とその価数により大きく異なる。多価金属塩はアルギン酸と反応すると水に不溶なゲルとなり、アルギン酸のカルボキシ基間で金属イオンと架橋結合することにより分子鎖の網目構造を形成するが、その基礎的理解はまだ不十分な点が多い。

## 2. 研究の目的

- (1) コラーゲンスポンジは構造安定化のために物理架橋、化学架橋を施すことが多く、化学架橋としてはグルタルアルデヒド (GA) を用いることが多いが、残留した未反応の GA の生体為害性が懸念される。
- そこで本研究では、Ⅰ型コラーゲンのスポンジを調製し、GA 及び同等の架橋作用が期待される 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (EDC) で化学架橋を施し、その架橋度を比較する。また、それぞれの濃度、架橋時間を変化させてその架橋状態を比較検討する。
- 生体適合性に優れるとともに、架橋剤による安全性の問題が排除され、医用基材として適切な物理的強度、生体安定性等

の生化学的特性を備えた実用的なコラーゲンスポンジの新規調製を試み、製造方法を確立することを目的としている。

- (2) 生体材料には、薄膜状、スポンジ状、ゼリー状、粒子状などがあり、必要に応じていずれの形状にすることも可能である。本研究では、有用性の高い薄膜状 (フィルム状) 細胞培養基質の開発を進めている。主に褐藻に含まれる多糖類の一種であるアルギン酸が、多価金属を取り込むことによってゲル化し、それが弾性を持つことに着目し、2 価金属として  $\text{Ca}^{2+}$ 、3 価金属として  $\text{Fe}^{3+}$  をアルギン酸ナトリウムに取り込み、表面修飾などの工程を経ない細胞培養基質として、生体安全性に適した材料の開発を目的としている。

## 3. 研究の方法

- (1) 【コラーゲン基材の検討】

コラーゲンスポンジの作製

ブタ皮由来Ⅰ型コラーゲン (pH3.1 塩酸希釈：新田ゼラチン、0.5%) を凍結乾燥し、GA、EDC 溶液に浸漬させ架橋反応を施した。GA 濃度は 0.25、0.5、1.0、2.0% で架橋時間は 2 時間、EDC 濃度は 0.125、0.25、0.5、1.0% で架橋時間は 1、3、5 日間化学架橋処理し、再度凍結乾燥して得られた試料を 140℃ で脱水熱架橋してスポンジ状試料を作製した。

架橋率測定

架橋処理により得られたコラーゲンスポンジに  $\text{NaHCO}_3$  溶液、TNBS 溶液、HCl 溶液を順に添加し、分光光度計によって 345 nm の吸光度を測定した。架橋が導入されるとコラーゲン中のフリーアミノ基が減少することを利用し、コラーゲンの架橋率を見積もった。架橋率はトリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) 法によって測定した。

SEM 観察

コラーゲンスポンジの構造を SEM (S-2300, 日立) にて観察した。

粘度測定による架橋進行のリアルタイムモニター

Ⅰ型コラーゲンに EDC 溶液 (0.125、0.25、0.5、1.0%) を添加後、音叉型

振動式粘度計 (SV-10, エー・アンド・ディ) により 25 °C での粘度の経時変化をリアルタイムで測定した。

## (2) 【アルギン酸フィルム基材の検討】

### アルギン酸フィルムの調製

6 well プレートに 1% アルギン酸ナトリウム (ナカライテスク) を 3 ml 滴下し, 60 °C で一晩乾燥した。架橋剤として 0.5M の  $\text{CaCl}_2$  と  $\text{FeCl}_3$  を用いて架橋反応を施し, フィルム化した薄膜を作製した。ここで得られたフィルムをアルギン酸フィルムとした。架橋時間は  $\text{CaCl}_2$  について 2 時間,  $\text{FeCl}_3$  について 24 時間行った。

### 歯根膜線維芽細胞の培養

アルギン酸フィルムを滅菌水と 70% エタノールにて洗浄殺菌し, それを基材として正常ヒト歯根膜線維芽細胞 (HPdLF, Lonza) を培養した。6 well プレートに  $1 \times 10^4$  cells/ml に調製した細胞を 3 ml/well 播種し, 10% ウシ胎児血清 (FBS), 100 U/ml penicillin, 10 mM HEPES buffer を含む  $\alpha$ -MEM 培地で 37 °C, 5%  $\text{CO}_2$  気相下にて培養した。

### 吸着タンパク質の分析

Ca, Fe 架橋されたアルギン酸フィルムを,  $\alpha$ -MEM のみ (0% FBS), 通常培地 ( $\alpha$ -MEM + 10% FBS), FBS のみ (100% FBS) の条件で 3 日間浸漬させた後, 100 mM クエン酸ナトリウムにて溶解し, SDS-PAGE にかけてその溶液中に含まれる血清タンパク質を分離し, FBS (ウシ血清) をポジティブコントロールとして銀染色にて検出した。

### 薬剤徐放性の検討

DDS として相応するための予備的な実験として, 色素系のモデルドラッグ (アクリフラビン (AF) およびメチレンブルー (MB)) を含有させ, その放出挙動を分光法で評価した。500 mM  $\text{CaCl}_2$  を溶媒に 1% AF, 1% MB を調製し, 乾燥させた 1% アルギン酸ナトリウムに滴下して 2 時間架橋した。AF, MB が吸着したアルギン酸フィルムを一度洗浄し, 蒸留水を 3 ml 添加して 37 °C でインキュベートし, 2, 5, 12 時間, 1, 3, 5, 7 日間浸漬して溶出した AF, MB の吸光度の経時変化を測定した。アルギ

ン酸ナトリウムは, 低分子量 (100cp), 中分子量 (300cp), 高分子量 (500cp) を使用し, 分子量の違いによる薬剤徐放性の比較検討を行った。

### 機械的特性の検討

アルギン酸フィルムの機械的特性を検討するため, 短冊状試験片を作製して引張試験を行った。また, 水平固定したマイクロメーター (MDH-25M, ミツトヨ) にてフィルム厚を測定した。

## 4. 研究成果

### (1) 【コラーゲン基材の検討】

架橋処理によるコラーゲンのアミノ基の減少を架橋率とし, GA 架橋, EDC 架橋で比較すると, どちらも架橋濃度が高いほどアミノ基が減少していた。その減少率は EDC 架橋の方が高いことから, GA 架橋よりも EDC 架橋の方が架橋能は高いと考えられる。EDC 架橋においては, 架橋反応時間が長いほど架橋率が高くなる結果が得られた。(Fig.1) EDC 濃度 1.0% で 1 日架橋処理すると 60% 程度の架橋率が得られることから, 低い濃度で長時間架橋するよりも, 高い濃度で短時間架橋するほうが, 架橋効率がよいと考えられる。また, EDC 濃度が低いと架橋率のばらつきが大きくなる傾向も見られた。よって, 型コラーゲン溶液を EDC で架橋した結果, 濃度に依存して架橋率が増加していることが確認された。

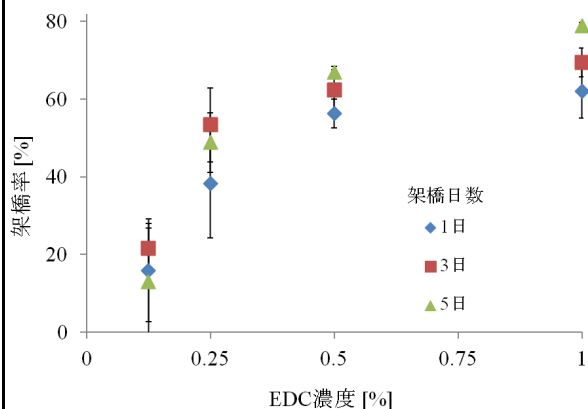


Fig.1

EDC 濃度 0.25% , 1 日架橋したコラーゲンスポンジの SEM 像 (S-2300 , 日立) を Fig.2 に示す . 今回得られたコラーゲンスポンジはいずれの濃度でも同じような多孔構造を呈していた . ただ , SEM 観察からは構造への架橋の影響を確認することはできなかった .

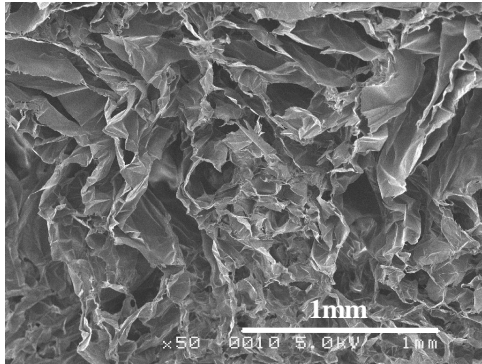


Fig.2

EDC 添加後のコラーゲン溶液の粘度変化を測定したところ , 架橋剤濃度に依存して粘度が上昇していることから ( Fig.3 ) 架橋の度合いを反映していることが確認された . 測定開始直後 , 粘度は急上昇したあと一度低下し , 再度上昇している . いずれの曲線についてもその傾向がみられ , 濃度が高くなるにつれてその傾向は大きくなり , 1.0% では顕著である . EDC 溶液を加えると局所的に pH が上昇することから , 一時的な高い pH でゲル化が壊され , EDC の十分な拡散後再度ゲルが形成されているものと解釈した . 粘度は 8 時間以内に平衡に達したことから , 架橋もこの時間で完了している可能性が高い . これにより , 粘度の経時的観察で架橋の進行をリアルタイムにモニターできたと考える .

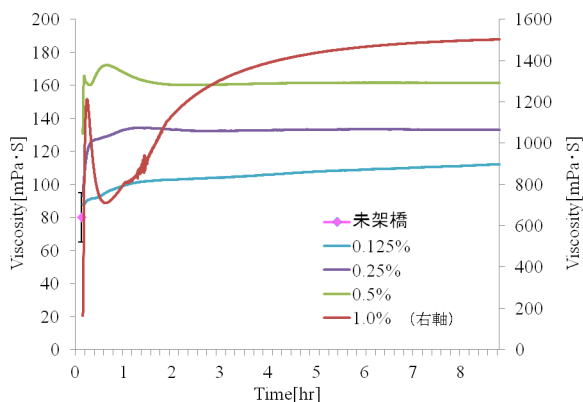


Fig.3

以上のことから , コラーゲンスポンジを薬剤徐放性の足場材料として利用する場合 , 従来化学架橋剤として主流である GA に対し , 臨床応用のための低為害性の代替架橋法として EDC 架橋は有用であるという結果を得ることができた .

## (2) 【アルギン酸フィルム基材の検討】

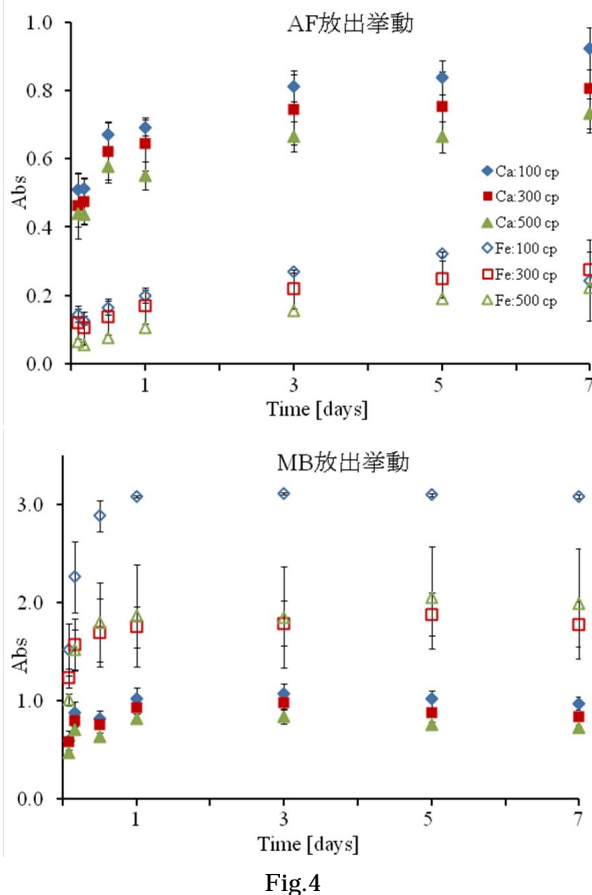
Ca 架橋で作製したアルギン酸フィルム上での HPdLF は , 1 日目には初期伸展が見られ , 3 日目には明確な細胞伸展が確認された . その後細胞は増殖し , 9 日目にはコンフルエントに至った . このことから , Ca 架橋のアルギン酸フィルムは細胞培養基質として資することが確認された . 本研究では , 細胞の伸展状態を確認する際 , フィルム上の細胞を確認するためにフィルムを培養プレートから別のプレートに移し替えて観察している . Fe 架橋のアルギン酸フィルムは , プレートに移し替えるのが困難な状態で , フィルムが破損した . 今回 , 培養の湿潤状態に耐えうる強度を有した Fe 架橋のアルギン酸フィルム作製が困難であったため , 物理的強度を備えたフィルムの作製方法の検討を引き続き行う必要がある .

-MEM ( 0%FBS ) に浸漬したサンプルからタンパク質は検出されなかったが , FBS を含有したサンプルからは , Ca , Fe 架橋どちらのアルギン酸フィルムからも FBS 中に最も多く含まれるタンパク質であるアルブミン ( Alb , 分子量 66 kDa ) のバンドが検出された . よって , アルギン酸フィルムには培養液に 10% 含有されている FBS が取り込まれ , 細胞の接着 , 伸展を助長しているものと考えられる .

AF , MB の放出挙動を Fig.4 に示す . Ca , Fe 架橋体どちらも 3 日目までは緩やかに吸光度が上昇し , 以後は平衡状態に至ることが確認された . 分子量による比較は , Ca , Fe 架橋共にほぼ全ての浸漬時間で 100 cp > 300 cp > 500 cp の順に吸光度が高い結果が得られ , 高分子量体よりも低分子量体で作製されたアルギン酸フィルムの方が色素の放

出挙動が顕著であることが確認された。アルギン酸ナトリウムが架橋されてゲルになると、ゲル中の解離イオン( $\text{Na}^+$ )が多いほど浸透圧が高くなり吸収力が高くなるために色素が放出しにくくなったものと考えられる。

モデルドラッグによる放出挙動の実験により、低分子量体のアルギン酸ナトリウムにて作製されたアルギン酸フィルムは、色素の放出能が高いという結果が得られたことから、適切な分子量の架橋性高分子を選択することにより、フィルム材料として適切な徐放スピードのコントロールが可能になる技術に応用できると考えられる。



機械的特性の検討による短冊状試験片での引張試験は、オートグラフのチャック部の応力集中で破損することが多く、適正な試料の作製が困難であった。再生医療のフィルム材料は通常湿潤環境で用いられることを考慮すると、特に Fe 架橋で得られたアルギン酸フィルムは湿潤状態で脆さを有することから、機械的特性に対する測定方法を再検討し、改善する必要がある。

水平固定したマイクロメーターによるフィルム厚の測定により、Ca 架橋で得られたアルギン酸フィルム厚は分子量が高くなるにつれて増大する傾向が見られた。低分子量体のアルギン酸フィルム厚は約 20  $\mu\text{m}$ 、中分子量体では約 30  $\mu\text{m}$ 、高分子量体では約 35  $\mu\text{m}$ であった。

Fe 架橋により得られたアルギン酸フィルムは、分子量の高低に差は見られなく、ほぼ 20  $\mu\text{m}$  のフィルム厚であった。

以上のことから、アルギン酸ナトリウムを  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$  により架橋して得られたアルギン酸フィルムを細胞培養基質として利用する場合、物理的な強度の改善という課題は残ってはいるが、湿潤状態での物理的強度を得ることができれば、安全性の高い培養基質として期待される。AF、MB をモデルドラッグとした薬剤徐放性の放出挙動で、低分子量体のアルギン酸フィルムは、高分子量体のアルギン酸フィルムと比較して、徐放の度合いが高い結果を得ていることから、出発原料に低分子量体のアルギン酸ナトリウムを用いることにより、細胞培養基質として有用であ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0件)

[学会発表](計2件)

佐々木かおり、齋藤設雄、根津尚史、平雅之．薬物徐放性を有する細胞培養用アルギン酸ゲルの調製と物性評価．第 61 回日本歯科理工学会学術講演会．平成 25 年 4 月 13 日．東京．

佐々木かおり、齋藤設雄、根津尚史、平雅之．薬剤徐放性コラーゲン基材の調製—架橋法による架橋効率の比較—．第 58 回日本歯科理工学会学術講演会．平成 23 年 10 月 22 日．郡山．

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

佐々木 かおり (SASAKI, Kaori)  
岩手医科大学・医療工学講座・助教  
研究者番号：364373

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：