

平成 22 年 6 月 4 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19592277  
 研究課題名（和文） DNA/キトサン/脂質複合体を用いたマルチレイヤーGTR, GBRメンブレンの開発  
 研究課題名（英文） Development of DNA/chitosan/lipid complex multi-layer membrane for GTR, GBR  
 研究代表者井上 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

研究成果の概要（和文）：DNA、キトサン、人工脂質を用いたマルチレイヤー化 GTR、GBR メンブレンについて検討を行った。また、DNA/キトサン/人工脂質フィルム、GTR 用メンブレン、Ti 板上でのマルチレイヤー化についても検討した。DNA/キトサン/人工脂質複合体メンブレンは、黄色ブドウ球菌、歯周病菌、真菌には抗菌・抗真菌性を示した。また、DNA/キトサン/人工脂質フィルム、GTR 用メンブレン上での多層化は可能で、上記と同じ抗菌・抗真菌性を示した。

研究成果の概要（英文）：The characteristics of experimental multi-layer GTR or GBR membrane made from DNA, chitosan and amphiphilic lipid was investigated. And also the possibility of multi-layer formation on the DNA/chitosan/lipid complex film or GTR membrane on the market or titan plate was investigated. DNA/chitosan/lipid complex multilayer membrane showed antibacterial activity against *Porphyromonas gingivalis* and *Staphylococcus aureus*, and antifungal activity against *Candida albicans*. The DNA/chitosan/lipid complex multilayer formed on the DNA/chitosan/lipid complex film or GTR membrane, and showed antibacterial activity and antifungal activity as DNA/chitosan/lipid complex multilayer membrane showed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
20 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
21 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴理工系歯学

キーワード：

(1) 生体材料 (2) DNA (3) キトサン (4) GTR (5) GBR (6) メンブレン

1. 研究開始当初の背景  
 歯周病の進行により生じる歯槽骨欠損を再生する GTR 法やインプラント治療のために

骨組織を再生する GBR 法など、再生医療の場においてメンブレンの臨床応用は広範囲に及んでいる。メンブレンは GTR 法におい

ては4~6週間、GBR法においては術後6~9ヶ月スペースを維持しておかなければならない。また、術後の感染を考慮すれば、抗菌性・抗真菌性を有することが望ましく、さらにメンブレンに骨誘導能が付加されれば、臨床応用は格段に増加すると考えられる。非吸収性のメンブレンとしてe-PTEEが汎用されているが、メンブレンの露出、感染の危険性、二次手術の必要性、および、その際の新生組織障害など多くの欠点が指摘されている。また、吸収性のメンブレンは、ポリ乳酸、ポリ乳酸-グルコール酸共重合体、合成コラーゲンなどが市販されているが、機械的性質に弱く、生体内での分解もコントロールできず、抗菌性・抗真菌性も有していないため新しい機能を持ったメンブレンの開発が望まれていた。

## 2. 研究の目的

筆者は、これまでに「人工脂質被覆糖類を用いた高分子膜によるサイトカインキャリア材の研究」、「サイトカイン含有DNAフィルムを用いた骨形成ドラッグデリバリーシステムの開発」で科学研究費の交付を受け、メンブレンとして合成した高分子膜やDNAフィルムにサイトカインを結合させ、骨の再生を試みてきた。その結果、これらのメンブレンにサイトカインを結合することは可能であり、骨の生成も認められ、抗菌性・抗真菌性を示したが、これらのメンブレンは静電的な結合により生成しているため、生体内の電解質の影響でいずれも分解が早い欠点を有していた。また、サイトカインを利用する方法においては、直接口腔内へのサイトカインの導入は、人体への全身的影響や、特に局所的に癌化するおそれが懸念されるため、問題を内包していると言える。

一方、筆者および共同研究者の福島は、DNAとキトサンを反応させ、DNA/キトサン複合体を合成し、生体内でもDNA/人工脂質複合体よりも分解速度が遅いことを明らかにした (Buffer solution can control the porosity of DNA-chitosan complexes. Fukushima T, Inoue Y et al :J Biomed Mater Res Part B. 2006; 76B: 121-139, PBS buffer solutions with different pH values can change porosity of DNA/chitosan complexes. Fukushima T, Inoue Y, et al :Dental Materials Journal. 2005; 24: 414-421)。また、筆者は第48回日本歯科理工学会において「DNA/キトサン複合体シートのGTRへの応用」の演題で、DNA/キトサン複合体が自由に成形でき、また、DNAのリン酸残基に人工脂質を更に付加させることが可能で、このDNA/キトサン/人工脂質複合体が抗菌性を示すことを報告した。さらに、共同研究者の福島、早川、岡畑らはTiプレートにポリ-d-リジンとDNAとのレイヤー・バイ・レイヤ

ーでマルチレイヤーを形成させた (Fabrication, characterization, and biological assessment of multilayered DNA-coatings for biomaterial purposes. T. Hayakawa, T. Fukushima, Y. Okahata et al : Biomaterials, 27, 691-701, 2006)。

そこで、筆者は以上の研究成果を基に、DNA、キトサン、人工脂質をレイヤー・バイ・レイヤーで結合させ、DNA/キトサン/人工脂質複合体マルチレイヤーを合成すれば、機械的な性質の向上や生体内での分解速度の遅延も可能で、抗菌性・抗真菌性も付与でき、また、長い塩基対を有するDNAを用いれば、更に機械的性質の改善も期待できるものと考えた。そして、DNA/キトサン/人工脂質複合体は加熱・加圧処理によってもフィルム化が可能であるため、このフィルムを基盤としたマルチレイヤーメンブレンについても検討を加え、さらに、基盤の素材を変え、マルチレイヤーメンブレンの可能性について多方面からの検討を加えることにした。

## 3. 研究の方法

### (1) 人工脂質の合成

筆者の現在までの研究成果から抗菌・抗真菌スペクトルが広がったC10-L-Ala/pts、C12-L-Ala/ptsの2種の脂質をアミノ酸と2種の高級アルコールとを反応させて合成した。即ち、アミノ酸にL-アラニンを選び、また、高級アルコールにはn-デシルアルコール、n-ドデシルアルコールを選び、パラトルエンスルホン酸とトルエン中で6時間反応させて合成し、アセトニトリルとエチルアセテートを用いて再結晶した。

### (2) DNA/キトサン/人工脂質の合成

DNAはサケ精子由来の塩基対が300bp、30000bp、7000bpのものを用いた。まず、DNA(300, 3000, 7000bp)を蒸留水に溶解した。次にキトサンを0.2Nの塩酸で溶解し、溶液中に0.2NのNaOHをpHが5になるまで滴下した。そしてDNA水溶液とキトサン溶液を攪拌混合し、生じた白色沈殿物を洗浄・遠心分離を3回繰り返した。次に(1)で合成した人工脂質を蒸留水に溶解し、合成した白色沈殿物を人工脂質水溶液中で攪拌混合した。3時間攪拌混合した後、水洗・遠心分離を繰り返した後、凍結乾燥を行い、白色沈殿物を得た。

### (3) 賦型性の検討

(2)で合成したDNA/キトサン/人工脂質複合体を少量の水と混合してペースト状にしたのち、凍結乾燥を行い、賦形性の検討を行った。また、凍結乾燥した複合体の表面性状をSEMで観察した。

### (4) 細胞毒性試験

細胞毒性用試料には、複合体を乳鉢で粉末にし、粉末を篩にかけて粒度45 $\mu$ m~100 $\mu$ m

の粉末を回収したものをを用いた。なお、試料は電子滅菌を行った。細胞には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た。培養 24 時間後、培養液を、試料 2 mg を含む  $\alpha$ -MEM 2 ml と換え、その後、37°C、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。

#### (5) 抗菌性の検討

合成した DNA/キトサン/人工脂質複合体の細菌 (*Porphyromonas gingivalis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*)、真菌 (*Candida albicans*) に対する抗菌性・抗真菌性を Disk diffusion 法で検討した。

#### (6) マルチレイヤーの検討

1) DNA/キトサン/人工脂質複合体を蒸留水で混和し、シリコン製型に填入後、加熱圧延してフィルムを作成する。そして、フィルムを DNA 水溶液、キトサン水溶液および人工脂質水溶液に浸漬し、DNA のリン酸残基にキトサンのアミノ基と人工脂質を反応させる。更に、ポリカチオンであるキトサンのアミノ残基に対して DNA のリン酸基を反応させ、その後、順次 DNA、キトサン、人工脂質を結合させ、マルチレイヤーメンブランを作成した。作成したマルチレイヤーメンブランの機械的性質、抗菌性・抗真菌性の検討を行った。

2) ポリ乳酸/グリコール酸共重合体メンブラン (市販 GTR メンブラン) を DNA 水溶液中に浸漬して風乾した後、メンブランをキトサン水溶液および人工脂質水溶液に浸漬し、1) と同様な方法で、マルチレイヤーメンブランを作成した。作成した、GTR メンブランの抗菌性・抗真菌性の検討を行った。

3) Ti のプレートをポリアリールアミン塩酸塩水溶液に 30 分間浸漬し、高分子電解質膜を形成する。そして、DNA 水溶液中で DNA と反応させ、風乾した。次に DNA を結合させた Ti プレートをキトサン水溶液に浸漬し、そして人工脂質水溶液に浸漬して DNA のリン酸残基にキトサンのアミノ基と人工脂質を反応させた。更に、ポリカチオンであるキトサンのアミノ残基に対して DNA のリン酸基を反応させ、その後、順次 DNA、キトサン、人工脂質を結合させ、マルチレイヤーの形成を試みた。作成した Ti プレート上のマルチレイヤーの抗菌性の検討を行った。

#### 4. 研究成果

L-アラニンと n-decyl alcohol, n-dodecyl alcohol から人工脂質を 2 種 (C10-L-Ala/pts, C12-L-Ala/pts) 合成した (図 1)。また、サケ精子由来の塩基対が異なる DNA (300bp、3000bp、7000bp) とキトサンから DNA/キトサ

ン複合体を各々合成した (図 2)。

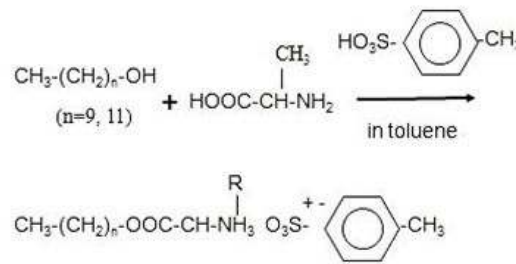


図1 人工脂質の合成

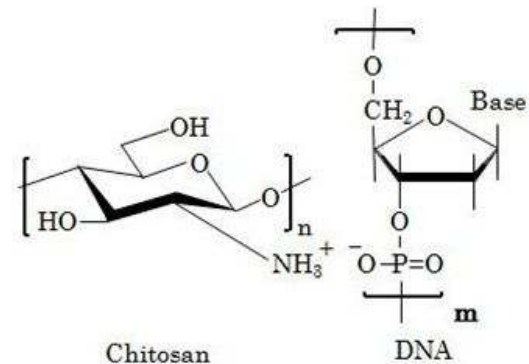


図2 DNA/キトサン複合体の合成

3 種の DNA とキトサンから合成した DNA/キトサン合成物はいずれも水不溶性で、白色で塩基対が長くなるとやや撚糸状を呈した。これらの合成物を水洗・遠心分離を繰り返した後、凍結乾燥を行い、白色粉末を得た。粉末にした状態では塩基対の長さによる影響は認められなかった。また、この白色粉末はスパチュラ等に付着しやすく、リン酸残基による静電気の存在が伺えた。この粉末を 2 種の人工脂質の水溶液中で攪拌させて人工脂質と反応させ、DNA/キトサン/人工脂質合成物を得た。合成物は DNA/キトサンと同様に水不溶性



図3 DNA/キトサン/人工脂質複合体粉末

の白色粉末であった (図 3)。得られた合成物を少量の蒸留水と混合してペースト状にしたのち、直径 5mm のシリコン型に入れて自然乾燥および凍結乾燥し、円形ディスク試料を作成した (図 4)。



図4 DNA/キトサン/人工脂質複合体成形ディスク

何れの方法でも成形性を保ち、賦形性は良好であった。表面のSEM像では繊維質の複合体が積層している状態が観察され、間隙も多く認められた(図5)。

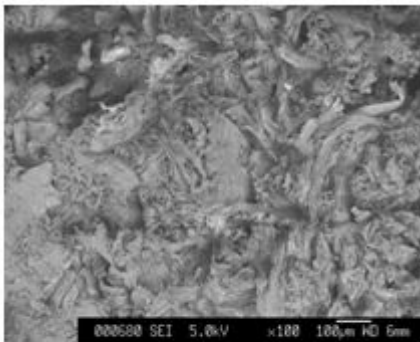


図5 DNA/キトサン/人工脂質複合体SEM像

また、フィルム化後の引っ張り強さは0.4MPaと低い値であり、やや堅い性状であったが、メンブランとして使用可能と考えられた。細胞毒性試験では、細胞生存率は86.2%(±8.25)と高い値を示し、細胞毒性は少ないものと考えられた。抗菌性・抗真菌性については、*Pseudomonas aeruginosa* には抗菌性が認められなかったが、*Staphylococcus aureus*、*Porphyromonas gingivalis* には抗菌性が認められ、また、

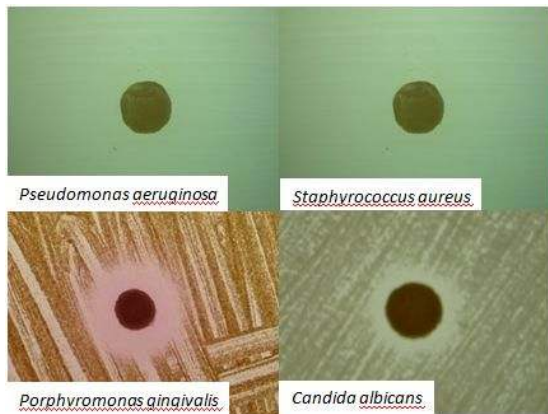


図6 DNA/キトサン/人工脂質複体の抗菌・抗真菌性

*Candida albicans* にも抗真菌性が認められた

(図6)。また、DNAの塩基対の長さを変えても抗菌性・抗真菌性は同様の結果が得られ、抗菌性・抗真菌性に塩基対の長さの影響は認められなかった。また、人工脂質の影響も認められなかった。

DNA/キトサン/人工脂質フィルムを基材にしたDNA/キトサン/人工脂質マルチレイヤーメンブランは、やや厚みを帯びDNA、キトサン、人工脂質が積層されているようだった(図7)。



図7 マルチレイヤー化後のDNA/キトサン/人工脂質フィルム像

また、DNA/キトサンフィルム/人工脂質は透明であったが、マルチレイヤー化で白色不透明となった。DNA/キトサン/人工脂質複合体と同様の抗菌性・抗真菌性を示した(図8)。



図8 マルチレイヤー化DNA/キトサン/人工脂質フィルムの抗菌・抗真菌性

また、DNA/キトサン/人工脂質フィルムは、乾燥時にはやや堅い性状であるが、水中に浸漬しとくとフレキシブルになり、GTRメンブランとしての力学的な性質は実用上適正であると考えた。

GTRメンブランを基材にしたDNA/キトサン/人工脂質マルチレイヤーメンブランも、やや厚みを帯びており、DNA、キトサン、人工脂質が積層されている推察された(図9)。それぞれの水溶液に浸漬することにより、メンブランにDNA、キトサン、人工脂質水溶液が浸透し、マルチレイヤー化していったものと考えられた。また、DNA/キトサン/人工脂質複合体と同様の抗菌性・抗真菌性を示した(図10)。

Tiプレート上のDNA/キトサン/人工脂質処理





図9 マルチレイヤー化後の



図11 マルチレイヤー化後の Ti表面像(右：研磨面、左：処理面)

表面は灰色に若干変色していたが、マルチレイヤーの形成は確認できなかった(図11)。この生成した膜に対してフィルム密着法で抗菌性を検討したが、明確な抗菌性・抗真菌性は認められなかった。ハロー法においても、同様に明確な抗菌性・抗真菌性は認められなかった。

DNA/キトサン/人工脂質複合体は、少量の蒸留水と混合すればペースト状になり、成形性、賦形性は良好であった。フィルム化後の引っ張り強さは低い値で、やや堅い性状を示したがメンブランとして使用可能と考えられた。DNA/キトサン/脂質複合体の力学的性質について、しなやかさの改善を意図してDNAの塩基対を変えた。合成時には3000bp、7000bpを用いた合成複合体は300bpを用いたときに比べて捻糸状を呈したが、凍結乾燥後の性状には変化は認められず、フィルム化後も明らかになしなやかさの改善は認められなかった。抗菌性については、*Staphyrococcus*

*aureus*、*Porphyromonas gingivalis*、*Prevotella intermedia* に対して抗菌性を示したが、*Pseudomonas aeruginosa* には抗菌性を示さなかった。また、*Candida albicans* にも抗真菌性を示した。また、塩基対の長さを変えても抗菌性に変化は認められなかった。細胞毒性は、マウス由来の繊維芽細胞 L-929 の細胞生存率は高い値を示し、細胞毒性は少ないものと考えられた。一方、DNA/キトサン/人工脂質複合体フィルム、ポリ乳酸/グリコール酸共重合体(GTRメンブラン)を基材にしたDNA/キトサン/人工脂質マルチレイヤーメンブランにも抗菌性、抗真菌性が認められた。以上のことから、DNA/キトサン/人工脂質複合体を用いてGTRメンブランを開発することは可能と考えられたが、GBRについては、さらに検討が必要と考えられた。

#### 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5件)

- ① T. Fukushima, M. Kawaguchi, T. Hayakawa, S. Takeda, Y. Inoue, J. Ohno, K. Taniguchi, Drug binding and releasing characteristics of DNA/lipid/PLGA film, Dental Materials Journal, 査読有り, 26, 2007, 854-860
- ② T. Hayakawa, T. Fukushima, M. Kawaguchi, Y. Inoue, Preparation and tissue response of lipid-coated b-FGF, Journal of Oral Tissue Engineering, 5, 2007, 96-103
- ③ T. FUKUSHIMA, M. KAWAGUCHI, T. HAYAKAWA, J. OHNO, T. IWASHASHI, K. TANIGUCHI, Y. INOUE and S. TAKEDA, Complexation of DNA with Cationic Polyamino Acid for Biomaterial Purposes, Journal of Oral Tissue Engineering, 査読有り, 26, 2008, 24-32
- ④ M. KAWAGUCHI, T. FUKUSHIMA, T. HAYAKAWA, Y. INOUE and J. OHNO, Pre-intercalated DNA/Lipid/PLGA Film as a Drug Carrier, Journal of Oral Tissue Engineering, 査読有り, 26, 2008, 97-105
- ⑤ Fukushima T., Ohno J., Hayakawa T., Kawaguchi M., Inoue Y., Takeda S., Toyoda M., Okahata Y., Mold fabrication and biological assessment of porous DNA-chitosan complexes., J Biomed Mater Res B Appl Biomater., 査読有り, 91, 2009, 746-754

[学会発表] (計7件)

- ① 早川 徹, 福島忠男, 川口 稔, 井上勇介, 岡畑恵雄, DNA/キトサン複合体の特性および加工性、高分子学会第36回医用高分子シンポジウム、平成19年7月31日、東京都
- ② 川口 稔, 早川 徹, 井上勇介, 福島忠男,

岡畑恵雄、DNA/人工タンパク質複合体の合成と透明フィルム体の調製、第29回日本バイオマテリアル学会大会、平成19年11月27日、大阪府豊中市

③川口 稔、大野 純、早川 徹、井上勇介、福島忠男、疑似体液中におけるDNA/キトサン複合体フィルム上へのアパタイト形成、日本歯科理工学会、平成20年4月26日、横浜市

④福島忠男、大野純、川口 稔、岩橋輝明、井上勇介、早川 徹、DNA/キトサン複合体のインジェクタブルスキャホールド材への応用、日本再生歯科医学会、平成20年9月13日、東京都

⑤川口 稔、福島忠男、大野純、山崎純、井上勇介、早川 徹、DNA/ポリアミノ酸複合体のスキャホールド材への応用、日本再生歯科医学会、平成20年9月13日、東京都

⑥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、平成21年度第53回日本歯科理工学会学術講演会、平成21年4月11日、東京都

⑦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、平成21年度第54回日本歯科理工学会学術講演会、平成21年10月1日、鹿児島市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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：2010568

### (2) 研究分担者

福島 忠男 (FUKUSHIMA TADAO)  
福岡歯科大学・歯学部・准教授  
研究者番号：80084250  
早川 徹 (HAYAKAWA TOHRU)  
鶴見大学・歯学部・教授  
研究者番号：40172994  
岡畑恵雄 (OKAHATA YOSHIO)  
東京工業大学・大学院・生命理工  
学研究科・教授  
研究者番号：80038017  
川口 稔 (KAWAGUCHI MINORU)  
福岡歯科大学・歯学部・講師  
研究者番号：10122780  
谷口邦久 (TANIGUCHI KUNIHISA)  
福岡歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号：90105685