

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 22 日現在

機関番号：32703

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792300

研究課題名（和文） 新規合成バイオカップリング剤を応用した歯槽骨再生療法の開発

研究課題名（英文） Study on alveolar bone reconstruction therapy that applies the novel bio-coupling agents.

研究代表者

大橋 桂 (OHASHI KATSURA)

神奈川歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：30350531

研究成果の概要（和文）：

骨の再生療法に使用される補てん材と親和性の高い表面処理剤を新たに開発・合成し、骨芽細胞の接着性、骨形成能力を向上させる目的で研究を行った結果、新規の表面処理剤 5 種類の合成に成功し、すべての処理剤で細胞の接着性を向上させることができ、細胞の分化誘導も促進することを確認した。これらをもとにマウスを用いた移植実験を行い骨形成能の評価したところ、細胞の増殖は確認できたが、骨を再生するには至らなかった。

研究成果の概要（英文）：

We have synthesized 5 novel surface treatment agents having a high affinity for the scaffold used in the alveolar bone reconstruction therapy, to improve adhesion and differentiation induction of osteoblasts. The results showed to improve adhesion and to accelerate differentiation induction of the osteoblasts, in all treatment agents. However, these agents did not reconstructed bone to experiment transplantation in SCID mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：歯科材料

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生医学

キーワード：シランカップリング剤，バイオカップリング剤，再生医療，

ハイドロキシアパタイト，移植実験

1. 研究開始当初の背景

世界的にも急速に高齢化が進む日本社会において、いかにして高齢化世代に対応できる歯周病治療技術を開発するかが問題となる。65 歳以上人口では、約 90% が歯周疾患に罹患しており、その約 90% 以上に歯の喪失がみられ、平均して 10 本以上喪失歯を有している（平成 17 年度歯科疾患実態調査より）。さらに歯周疾患による咀嚼機能の崩壊が、高齢者における QOL（生活の質）および ADL（日常生活動作能力）に大きく影響を及ぼす事も報告されている。したがって、高齢者の歯周病治療は疾病の治療のみでなく、積極的

に歯周組織を再構築する再生医療技術の研究開発が必要である。また、歯周組織の中でも歯槽骨はハイドロキシアパタイト（HAP）あるいは β -TCP をスキャホールドとして用いる医科の骨再建技術を応用することで比較的研究しやすい分野である。

我々の研究室では、スキャホールドとなる HAP や β -TCP と骨芽細胞の親和性を向上させる目的で、種々の接着性タンパク質を検討したところ、細胞の初期接着性を高めることは可能であったが骨芽細胞を効果的に長くスキャホールドに固定するには至らなかった。そこで本研究では、 β -TCP と細胞の親

和性を高めるために、バイオカップリング剤の合成を試みた。

申請者らの開発した本バイオカップリング剤は、 β -TCP 表面の水酸基と反応するケイ素化合物、また細胞から産生される接着性タンパク質と反応するアミノ基やアミド基を有し、本剤で処理した β -TCP は細胞接着性が向上し、さらに骨の形成促進作用があることが認められている。

2. 研究の目的

現在、歯周組織の再建療法は、一部健康保険の適応となり一般的になりつつあるが、臨床適応は限られたものである。特に、歯周病により歯が喪失すると歯槽骨の吸収が著しく、その後の欠損補綴も困難になる。一方、整形外科領域ではスキャホールドを用いた骨再建が一般的に行われており、歯槽骨でも同様の技術で再建されることが望まれる。本研究ではスキャホールドに用いられるハイドロキシアパタイトや β -TCP 表面の細胞親和性を向上させる目的で新規表面処理剤（バイオカップリング剤）を開発して骨芽細胞の細胞接着性を検討し、間葉系細胞移植治療による新たな顎骨再建法の開発を試みる。

3. 研究の方法

(1) 新規バイオカップリング剤の合成

バイオカップリング剤の合成には、出発物質としてアミド基を有する 1,3-ジアリル尿素やマレイミド、アロバルビタールなどを用いて、溶媒にテトラヒドロフラン、触媒には塩化白金(IV)酸テトラヒドロフラン溶液を加え、滴下ロートよりトリメトキシシランを少しずつ攪拌しながら加える。その後、20 時間還流し、減圧留去した後、減圧蒸留することで最終生成物であるアミド基を有するシランカップリング剤を得る。得られた生成物の同定は、¹H-NMR、FT-IR および Mass の各スペクトルにより行う。

(2) 合成した新規バイオカップリング剤の評価

① in vitro による基礎実験および評価

バイオカップリング剤の骨芽細胞に対する接着性の評価は、バイオカップリング剤で表面を改質したガラス板を用いて細胞の付着性をルシフェラーゼアッセイにより評価する。また、ディッシュ表面をバイオカップリング剤で処理したガラス製細胞培養用ディッシュを用いて、石灰化誘導培地で骨芽細胞を培養し、ノジュール形成量を指標にバイオカップリング剤の細胞接着・分化促進効果の評価を行う。

② in vivo による骨形成能の評価

表面改質した β -TCP を用いてマウス骨芽

細胞と 3 次元共培養し、細胞- β -TCP 複合材料を形成し試料を作製する。この試料を免疫不全マウスの皮下へ移植し、数日後に同細胞の骨形成を免疫組織学的に検討しその効果を判定する。

4. 研究成果

(1) 新規バイオカップリング剤の合成

数種類の新規のバイオカップリング剤の合成を試みた。その結果、1,3-ジアリル尿素から 1,3-DAU6M を、マレイミドから MI3M を、アロバルビタールから AB6M を、イソシアヌル酸ジアリルから DI6M を、イソシアヌル酸トリアリルから TI9M をそれぞれ得ることに成功した。得られた生成物の同定は ¹H-NMR、FT-IR および Mass の各スペクトルにより行った。

(2) 合成した新規バイオカップリング剤の評価

新規合成したバイオカップリング剤で表面を改質したガラス板を用いて細胞の付着性をルシフェラーゼアッセイにより評価したところ未改質群と比較しすべてのバイオカップリング剤処理群で有意に高い細胞の付着性を確認した。また 1,3-DAU6M と AB6M が特に高い細胞接着性が得られた。さらに、ディッシュ表面をバイオカップリング剤で処理したガラス製細胞培養用ディッシュを用いて、石灰化誘導培地でマウス骨芽細胞を培養し、ノジュール形成を評価したところ、AB6M は短期間にノジュールが形成され、細胞の分化誘導能を促進した。

続いて、表面改質した β -TCP を用いてマウス骨芽細胞- β -TCP 複合材料を形成し、この試料を免疫不全マウスの皮下へ移植し、同細胞の骨形成を組織学的に検討したところ、 β -TCP 内に細胞浸潤は認められるが骨様組織の形成は認められず、線維種様の増殖が観察されたことから、細胞の癌化に伴い骨芽細胞能が失われた可能性が考えられた。

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 4 件)

(1) 大橋 桂, 二瓶智太郎, 三宅 香, 清水統太, 寺中文子, 芹田枝里, 原 健一郎, 近藤行成, 好野則夫, 寺中敏夫: 疎水性基含有シランカップリング剤の細胞毒性. 日本歯科保存学雑誌, 査読有り, 56, 2013, 25-30.

(2) Nihei T, Omoto N, Ohashi K, Kondo Y, Yoshino N and Teranaka T: Effect of enamel surface modification by novel aqueous phosphate-type fluoride surfactants.

Dental Materials Journal. 査読有り, 32, 2013, 83-87.

(3) 三宅 香, 大橋 桂, 二瓶智太郎, 清水統太, 山口真一郎, 近藤行成, 好野則夫, 寺中敏夫: 抗菌性シランカップリング剤の細胞毒性. 重合性基を有しフルオロアルキル基とベンゼン環を導入した新規シランカップリング剤の合成と接着耐水性効果. 日本歯科保存学雑誌, 査読有り, 54, 2011, 393-398.

(4) 清水統太, 二瓶智太郎, 倉田茂昭, 大橋 桂, 近藤行成, 好野則夫, 寺中敏夫: 重合性基を有しフルオロアルキル基とベンゼン環を導入した新規シランカップリング剤の合成と接着耐水性効果. 日本歯科保存学雑誌, 査読有り, 54, 2011, 177-189.

[学会発表] (計15件)

(1) 三宅 香, 二瓶智太郎, 富山 潔, 長谷川晴彦, 向井義晴, 大橋 桂, 清水統太, 熊田秀文, 近藤行成, 好野則夫, 浜田信城, 寺中敏夫: イクロコスムバイオフィルムに対する抗菌性シランカップリング剤の抗菌効果. 2012年度秋季学会(第137回)日本歯科保存学会, 2012年11月23日, 広島.

(2) 大橋 桂, 二瓶智太郎, 押川亮宏, 鈴木敏行, 好野則夫, 寺中敏夫: 各種修復材料の表面粗さと表面自由エネルギーについて. 2012年度秋季第60回日本歯科理工学会学術講演会, 2012年10月14日, 福岡.

(3) 二瓶智太郎, Kunzelmann KH, 大橋 桂, 押川亮宏, 鈴木敏行, 好野則夫, 寺中敏夫: ポリフルオロアルキル鎖を含むシランカップリング剤に関する研究(第14報) - 混合シランカップリング剤処理層の微細構造について -. 2012年度秋季第60回日本歯科理工学会学術講演会, 2012年10月14日, 福岡.

(4) Nihei T, Kunzelmann K-H, Ohashi K, Hickel R, and Teranaka T: Wear resistance of commercial restorative flowable composite. 6th Annual Congress of the pan European of the IADR, 2012年9月14日, Finland.

(5) 大橋 桂, 二瓶智太郎, 三宅 香, 清水統太, 芹田枝里, 原 健一郎, 寺中文字子, 大橋崇明, 小泉忠彦, 近藤行成, 好野則夫, 寺中敏夫: フッ素系シランと芳香族系シランの細胞毒性について. 2012年度春季学会(第136回)日本歯科保存学会, 2012年6月29日, 沖縄.

(6) 三宅 香, 熊田秀文, 二瓶智太郎, 大

橋 桂, 清水統太, 原 めぐみ, 近藤行成, 好野則夫, 浜田信城, 寺中敏夫: 抗菌性表面改質剤の歯科への応用(II) - 抗菌性シランカップリング剤の抗菌効果 -. 2012年度春季学会(第136回)日本歯科保存学会, 2012年6月29日, 沖縄.

(7) 二瓶智太郎, Kunzelmann KH, 大橋 桂, 三宅香, 大橋崇明, 寺中文字子, 芹田枝里, 原健一郎, 寺中敏夫: Three-body-wear testによる修復用コンポジットレジンの摩耗性について(第2報) - 新規レジノモノマーを含む市販コンポジットレジンの摩耗性 -. 2012年度春季学会(第136回)日本歯科保存学会, 2012年6月29日, 沖縄.

(8) 二瓶智太郎, Kunzelmann KH, 大橋 桂, 田中隆博, 鈴木敏行, 寺中敏夫: ACTA machineによるコンポジットレジンの耐摩耗性について(第2報) - 市販コンポジットレジンの耐摩耗性 -. 2012年度春季第59回日本歯科理工学会学術講演会, 2012年4月15日, 徳島.

(9) 二瓶智太郎, 大橋 桂, 三宅 香, 田中隆博, 山中秀起, 寺中敏夫: 耐水性を有するシランカップリング剤の物理化学的特性について. 第30回日本接着歯学会学術大会, 2012年1月21日, 函館.

(10) 二瓶智太郎, K-H Kunzelmann, 倉田茂昭, 山口真一郎, 大橋 桂, 三宅 香, 清水統太, 芹田枝里, 原 健一郎, 近藤行成, 好野則夫, 寺中敏夫: フッ化炭素鎖を含む表面処理剤の歯科への応用(XX) - 混合シランの物理化学的特性 -. 2011年度秋季学会(第135回)日本歯科保存学会, 2011年10月21日, 大阪.

(11) Miyake K, Ohashi K, Nihei T, Kurata S, Shimizu T, Kondo Y, Yoshino N, and Teranaka T: Cytotoxicities of tooth surface modifiers having antibacterial potency. 45th Meeting of the IADR-Continental European Division with the Scandinavian Division and Israeli Division, 2011年9月3日, Budapest.

(12) Nihei T, Kunzelmann K-H, Yamaguchi S, Ohashi K, Miyake K, Shimizu T, Suzuki T, Hickel R, and Teranaka T: Wear resistance of resin-based commercially restorative composites. 45th Meeting of the IADR-Continental European Division with the Scandinavian Division and Israeli Division, 2011年9月1日, Budapest.

(13) 三宅 香, 大橋 桂, 二瓶智太郎, 大橋 桂, 山口真一郎, 小泉忠彦, 近藤行成, 倉田茂昭, 好野則夫, 寺中敏夫: 抗菌性表面処理剤の歯科への応用 (2) - 抗菌性シランカップリング剤の合成と細胞毒性について - . 2011 年度春季学会 (第 134 回) 日本歯科保存学会, 2011 年 6 月 10 日, 千葉.

(14) Nihei T, Kunzelmann K-H, Shimizu T, Ohashi K, Miyake K, Kurata S, Kondo Y, Umemoto K, Yoshino N, Teranaka T: Water resistance of novel silane having hydrophobic and polymerizable group. International dental materials congress 2011, 2011 年 4 月 29 日, Seoul.

(15) Nihei T, Karl-Heinz Kunzelmann, Ohashi K, Tamanaka H, Kondo Y, Yoshino N, Teranaka T: Water resistance of newly synthesized hydrophobic silane coupling agents. The 4th International Congress on Adhesive Dentistry, 2011 年 4 月 16 日, Seoul.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大橋 桂 (OHASHI KATSURA)

神奈川歯科大学・歯学部・助教

研究者番号: 30350531