

ナノポア制御による歯周組織再生能力を有する人工歯根膜の開発

棟方 正信 [北海道大学大学院工学研究科／教授]
田島 健次 [北海道大学大学院工学研究科／助教授]
佐藤 康治 [北海道大学大学院工学研究科／助手]
柏崎 晴彦 [北海道大学大学院歯学研究科／助手]
鈴木 健 [井原水産株式会社／研究員]
永井 展裕 [井原水産株式会社／研究員]

第1章 事業の背景・目的

近年の日本における医療技術の進歩はめざましく、それに伴って我が国はかつてない高齢化社会を迎えようとしている。しかし残念ながら、高齢化が進むにつれ生活の質が保持できていないのが実情である。特に健康的な生活を送る核となるのが食生活であるが、35歳以上の日本人のほとんどが歯周病に罹患していると言われている。咀嚼行為は健康を保つために必須であり、ボケ防止にも役立つ。QOL (Quality of Life) を向上させ、健康寿命を長くという社会の要求に応えるために、安全で経済的な歯周組織再生医療が確立されることが望まれる。

1.1. 歯周組織

歯周組織は歯肉、歯根膜、歯槽骨、セメント質からなる。歯周組織は歯を支持し、咀嚼に大きく関わっている。健康なヒトの歯には、噛む瞬間に数十キロもの荷重がかかる。そのため、歯や歯周組織は非常に強固な構造になっている。歯周組織は以下の4つの組織から構成されている(図1)。

(1) 歯肉

歯の歯頸部を取り囲んでいる上皮と結合組織が歯肉である。これは、異物や細菌などが組織に進入するのを防ぐ役割を担っている。

(2) 歯根膜

歯根膜は歯根を取り巻く組織である。その主な機能は、セメント質と歯槽骨とを結合させ、歯を顎骨に固定し、強力な咀嚼力を緩衝することである。

(3) 歯槽骨

歯槽骨は歯の支持機構のうち最も重要な組織であり、その主な機能は咀嚼時やその他の歯の接触時に生じる力の分散、吸収である。

(4) セメント質

セメント質は歯根を覆っており、石灰化した組織として知られ、主な機能は歯根膜線維と歯根を結合させることにある。

1.2. 歯周病

歯周病は歯に並ぶ二大疾患のひとつであり、歯の支持組織の破壊を伴う疾患である。また、罹患率の高い疾患であり重度に進行すると歯の喪失を招く。歯周病はその進行段階に応じて歯肉炎と歯周炎に分類される(図2)。歯周病の初期段階は歯周炎と呼ばれ、歯垢(プラーク)が歯肉溝にたまり歯肉縁が炎症を起こすことが原因である。この段階では細菌のすみかとなる歯周ポケットは2-6mmであり、まだ浅い状態である。この時点ではまだ歯槽骨や歯根膜の破壊はなく、元の歯茎に戻ることが可能である。さらに進行が進むと歯周炎まで発展することがある。この段階では、歯肉と歯根の結合の破壊や歯槽骨、歯根膜も破壊され、歯周ポケットが深くなる。この状態では自然には歯周組織は元に戻らず、外科的治療を必要とする。

1.3. 歯周病治療

歯周病の原因はプラークであるため、その予防や初期段階における対策は徹底したブラッシングである。残念ながら進行してしまった歯周病に関して、過去には拔牙が通例であった。しかし現在で、歯を保持することは健全な生活を送るために必須であると考えられ、可能な限り歯を保存するといった治療法が一般的である。中でも、自己の細胞を利用してその再生力を促進することによって、もとの組織に戻る再生治療法が最も効果的である。

歯周病治療の究極的な目標を歯周組織の再生と考えた場合、新生セメント質および新生歯槽骨に歯根膜線維が埋入した新生歯根膜組織が再生されることが重要である。このような再生形態を得る現在の治療方法として期待されているのが、GTR法(Guided Tissue Regeneration、組織再生誘導法)である。

通常の外科術式では歯肉上皮が創面を被覆するスピードが早いので、セメント質や歯根膜が再生する前に創面が上皮で覆われてしまう。これを上皮性付着と言い、再発の多い修復形態となる(図3左上)。GTR法はそれを防ぐために、歯肉上皮の創面への進入をPVDF膜(ポリフッ化ビニリデン膜)で遮断し再生空間を確保することで、再生能力を有する歯周細胞をその空間に誘導し元の状態に再生させる再生治療法である(図3右上)。

しかしGTR法は、誘導される細胞が再生空間に十分にならない場合には効果がなく、また、組織再生に長時間を有するなど、組織再生治療としては不十分なものである。従って、歯根膜細胞、セメント芽細胞、歯槽骨細胞やそれらに分化する幹細胞の補充、さらに、組織誘導を促進する走化、接着、増殖、分化因子(サイトカイン)の補充によって(図3左下)、前記GTR法よりも好ましい再生形態が得られるものと期待される(CGM(Cementum-impregnated Gelatine Membran

法、図3右下)。

このような細胞やサイトカインを補充する担体として、生体吸収性の合成高分子(ポリ乳酸、ポリグリコール酸)や天然高分子(コラーゲン、ゼラチン)を用いるのが一般的である。特に、コラーゲンは生体由来の高分子で、細胞親和性が高い、抗原性が低い、生体吸収性が高いなど、他の高分子に比べて優れた特性を有しており、人工歯根材料として好適であると考えられる。以下、コラーゲンについてその特徴を説明する。

1.4. コラーゲン

コラーゲンは細胞外マトリックスの主成分であり、細胞の支持、増殖の足場として細胞を結合して臓器や組織を形成しており、動物の体の構築には欠かせない支持タンパク質である。コラーゲンは、アミノ酸配列において3個目ごとにグリシン残基が存在し、残りの二つの残基中にプロリンが高頻度で存在する一次構造を持ったペプチド鎖が3本螺旋構造を有したタンパク質である。分子の種類に対応して様々なタイプのコラーゲンがあるが、分子を構成する3本鎖の種類が異なるものもあれば、同一のポリペプチド鎖が3本よりあっているものもある。一般的にコラーゲンと呼ばれているものはI型コラーゲンであり、これは線維性コラーゲンに分類される。

コラーゲンはその優れた生体適合性から化粧品原料や医療用材料として幅広く応用されている。特に医療用材料としては、優れた細胞接着性を有することから、組織工学における細胞の足場(scaffold)としての利用が盛んに行われている。

このようなコラーゲン原料として、これまで牛や豚、鶏由来の動物性コラーゲンが使用されてきたが、狂牛病の発生以来、家畜由来未知感染症の伝播の可能性が指摘され、動物性コラーゲンの安全性への疑問が生じてきている。それに代替するものとして期待されているのが動物性のような感染症の心配が潜在的に低い、魚から抽出した魚類由来のコラーゲンである。しかし、魚類由来コラーゲンは変性温度が低いものが多く、生体内温度(37℃)では変性して溶解してしまうため、バイオマテリアルとしてほとんど応用されていないのが現状である。

1.5. コラーゲンの架橋

上記のような魚類由来コラーゲンの低い熱安定性はコラーゲン分子間に架橋を導入することで改善が可能である。一般に、コラーゲンをバイオマテリアルとして利用する場合、その生体吸収性や物性をコントロールするために架橋処理を行うことが多く、さまざまな種類の架橋方法がこれまでに報告されている。架橋処理は大きく分けて、化学架橋と物理架橋の2種類に分類できる。

(1)化学架橋

化学架橋は化学剤を使用してコラーゲン分子間に架橋を導入する方法である。最も良く用いられてきた化学架橋剤はグルタルアルデヒド(GA)である。GAは酵素の固定化をはじめとして多くのタンパク、特にコラーゲンからなる体内インプラント剤などの架橋と殺菌保存剤として使われてきた。しかし、ほかの架橋剤に比べて細胞毒性が強いことが知られている。さらに、GA処理によりコラーゲンが黄変したり、柔軟性が失われるという欠点も有している。

ポリエポキシ化はGAよりも細胞毒性が低い架橋剤として用いられている。また、この架橋によって得られたコラーゲンはGA架橋と異なって、黄変することがなく天然組織と同様の柔軟性を付与できることが知られている。

カルボジイミドはペプチド合成の縮合剤として用いられる架橋剤である。その主な利点は、反応終了後の過剰試薬および反応生成物である尿素誘導体が容易に洗浄除去でき、分子内にそれらが残らないので細胞毒性が小さいことにある。

その他に、イソシアネート、ゲニピンなどの化学架橋剤が知られている。

(2)物理架橋

物理架橋は化学剤を使用せずに物理的に架橋する方法で、紫外線(UV)照射、γ線照射、熱脱水(DHT)架橋がある。UVは透過性が悪く、厚みのある物質を照射した場合、内部までUVが届かず不均一な架橋処理となる場合が多く、担体表面の架橋処理に適している。γ線は透過性が良いので梱包した製品の滅菌など工業的によく用いられているが、専用の設備が必要である。DHT架橋は真空状態で高温にすることによって、縮合反応が起こって分子内に架橋が入ることを特徴とし、真空乾燥機を用いて行うことが可能である。

1.6. 研究目的

現在の歯周病治療法は理想的な歯周組織の再生までは至らず、その改善が重要課題となっている。本研究の目的は、理想的な歯周組織再生能を有する人工歯根材料の開発である。

本研究は、人工歯根材料として魚類由来である鮭皮由来コラーゲン(SC)を使用し、人工歯根材料の孔径、形状、作成法、強度増加法、殺菌法、歯周組織細胞との親和性(増殖性、分化維持能)を検討した。SCの変性温度は約19℃と低く、生体内温度では変性・溶解するため、架橋処理による安定化の検討を行った。また、サイトカインの徐放化を検討するために材料の形状は多孔性スポンジとした。

第2章 細胞培養および増殖・分化評価方法

本研究では、鮭皮由来コラーゲン(SC)スポンジの細胞親和性を評価するために、矯正歯科治療時に得た歯根膜細胞(歯周靱帯細胞)を使用してコラーゲンスポンジ内で*in vitro*培養を行い、細胞増殖性と分化維持能を測定した。

2.1. 細胞

本研究では矯正歯科治療時に得たヒト歯周靱帯細胞(human periodontal ligament cells, hPDL)を使用した。大阪歯科大学歯周病学講座にて、矯正使用時に得られた健全なヒト歯周靱帯を初代培養することにより得られた細胞をDMEM(+)にて継代培養し、実験に用いた。

2.2. 試薬、培地

本研究で使用した試薬、培地は下記の通りである。

DMEM(+)

500ml	ダルベッコ変法イーグル培地 (フェノールレッド含有)
55ml	牛胎児血清
5ml	抗生物質

w-DMEM(+)

500ml	ダルベッコ変法イーグル培地 (フェノールレッド不含)
55ml	牛胎児血清
5ml	抗生物質

w-DMEM(-)

500ml	ダルベッコ変法イーグル培地 (フェノールレッド不含)
5ml	抗生物質

PBS(-)

137mM	NaCl
8.1mM	Na ₂ HPO ₄ ・12H ₂ O
2.68mM	KCl
1.47mM	KH ₂ PO ₄

Lysis Buffer

0.5 %	Triton X-100
150 mM	NaCl
10 mM	HEPES(pH7.4)

pNPP solution

18 mM	p-Nitrophenyl phosphate(pNPP)
20 mM	MgCl ₂
0.1 M	Tris-HCL(pH8.8)

2.3. 細胞培養法

本研究で使用した基礎培地は購入時のプロトコールに従った。継代培養の方法は常法に従い、セミコンフルエント(培養基材が50~70%覆われた状態)まで培養を行った後、

0.02%トリプシン/EDTA(Gibco)による細胞剥離、 5×10^3 cells/cm²で継代培養した。以下のコラーゲンスポンジ培養には継代数10~15代のhPDLを使用した。

(1) 継代培養方法

- ①セミコンフルエントになったhPDLをPBS(-)で2回洗浄した。
- ②0.02%トリプシン/EDTAを添加し、3分静置してhPDLを剥離した。
- ③DMEM(+)を添加しピペティングをして細胞懸濁液を遠沈管に移した。
- ④遠心した(500rpm, 5分)。
- ⑤ペレットにDMEM(+)を添加し、 5×10^3 cells/cm²になるように継代培養した。

2.4. コラーゲンスポンジ培養方法

架橋処理したSCスポンジに細胞懸濁液を添加して、スポンジ内培養を行った。第5章では、比較例としてSCと同様に調製した牛皮コラーゲン(BC)スポンジを使用し、SCスポンジと同時に培養した。

- ①コラーゲンスポンジを12穴プレートに入れて、クリーンベンチのUVランプで距離を30センチに設定して20分間UV照射し滅菌した。
- ②w-DMEM(+)を1ml添加し、30min培養した。
- ③細胞懸濁液(5×10^4 cells/ml) 100 μ lをコラーゲンスポンジに添加し60分培養した。
- ④900 μ lのw-DMEM(+)を添加し、3日間おきに培地交換しながら培養した。

2.5. 細胞増殖試験方法

架橋したコラーゲンスポンジはコラーゲナーゼに対する耐性が高く、コラーゲンを消化して細胞を剥離し血球計算板で細胞数を測定することが困難である。本研究では、細胞数測定方法として、Celltiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation assay Kit(Promega)を使用した。このアッセイキットは、生細胞によって代謝されたMTS代謝物(ホルマザン)を、その吸光度を測定することで細胞数を間接的に測定する方法である。ホルマザン吸光度と細胞数の間には相関関係があることはすでに確認している。

- ①培養したコラーゲンスポンジを新しい12穴プレートに移した。
- ②MTS溶液(MTS:PMS:w-DMEM(-)=1:0.05:5)を使用直前に調製した。
- ③MTS溶液を1ml添加し60分培養した。
- ④培養後のMTS溶液200 μ lを96穴プレートに移し、492 nmの吸光度を測定した。

2.6. 分化維持能評価方法

hPDLは分化の初期にアルカリフォスファターゼ(Alkaline phosphatase、ALP)を発現することが知られている。そこ

でALP発現量を測定し、コラーゲンスポンジ内で培養したhPDLの分化維持能を評価した。

- ①培養後のコラーゲンスポンジをPBS(-)で2回洗浄した。
- ②Lysis bufferを400 μ l入れた。
- ③4℃で30分間静置した後、ピペettingした。
- ④2000 rpmで2分間遠心した。
- ⑤上清100 μ lを96穴プレートに移し37℃で20分静置した。
- ⑥37℃に温めた2×pNPP solution100 μ l入れた。
- ⑦プレートリーダーで37℃で5分ごとに405 nmの吸光度を測定した。
- ⑧反応速度から活性を求めた。
- ⑨MTS吸光値(=細胞数)で標準化し、相対活性を求めた。

第3章 架橋処理による安定化

鮭皮由来コラーゲン(SC)は変性温度が約19℃と低く、生体内温度では変性して溶解するので、分子内および分子間に架橋を導入して安定化する必要がある。そこで、化学架橋として、グルタルアルデヒド(GA)、ポリエチレンジグリシジルエーテル(EGDE)、水溶性カルボジミド(EDC)、物理架橋として熱脱水(DHT)架橋を使用し、SCスポンジの安定化を試みた。

架橋率をトリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)法によって測定し、架橋時間と架橋率の関係を調べた。また、架橋したSCスポンジをPBS(-)に浸漬し、PBS(-)に対する溶解度を測定することによってSCスポンジ安定性を評価した。溶解度は溶解したコラーゲタンパク量をBicinchoninic acid(BCA)法によって求めた。

3.1 実験方法

(1) 鮭皮由来コラーゲン(SC)の精製

- ①脱脂したSCを0.2 M-酢酸4 L中に100 g添加した。
- ②基質量(皮中のコラーゲンの割合は約20 %)の1 %にあたる0.2gのペプシンを加えて攪拌した。
- ③10日後、8000rpm、30min 冷却遠心をして、不純物を沈殿させて除去した。
- ④上清を10Lに希釈し、ポアサイズ3 μ m、1 μ m、0.6 μ m、0.45 μ mのメンブランフィルターで順にろ過した。
- ⑤食塩を5%になるように添加し、一昼夜攪拌して塩析した。
- ⑥8000rpm、30min冷却遠心した後、沈殿を回収し、0.2 M酢酸に溶解させた。
- ⑦操作5、6を3回繰り返した。
- ⑧脱イオン水に対して約1週間透析した。
- ⑨溶液がゲル化した後、凍結乾燥して、-20℃で保存した。

(2) コラーゲンスポンジの作成

- ①コラーゲン凍結乾燥物を0.2M酢酸に0.5(w/v) %にな

るように添加し4℃で溶解した。

- ②0.5% SC溶液を24穴プレート(培養用ポリスチレン製、IWAKI)に1ml添加し、-70℃で1日間凍結した。
- ③凍結乾燥した。

(3) 化学架橋

A.GA架橋

- ①コラーゲンスポンジに1 % GA/4 M NaCl溶液を2ml添加し、4℃で静置した。
- ②0.1 Mグリシン溶液を2 ml添加して、4℃で2時間静置した。
- ③滅菌水で3回洗浄した。
- ④-70℃で凍結後、凍結乾燥した。

B.EGDE架橋

- ①コラーゲンスポンジに1% EGDE/4 M NaCl溶液を2ml添加し、4℃で静置した。
- ②滅菌水で3回洗浄した。
- ③-70℃で凍結後、凍結乾燥した。

C.EDC架橋

- ①コラーゲンスポンジに1% EDC/4M NaCl溶液を2 ml添加し、4℃で静置した。
- ②滅菌水で3回洗浄した。
- ③-70℃で凍結後、凍結乾燥した。

D.物理架橋(熱脱水架橋)

- ①コラーゲンスポンジを五酸化リン入りデシケーターで乾燥した。
- ②コラーゲンスポンジを真空乾燥機に入れて、減圧した。
- ③減圧度が76mmHgになったところで110℃になるように加熱を開始した。
- ④加熱後、温度を室温まで下げ大気圧に戻した。

(4) 架橋率測定(TNBS法)

- ①架橋したコラーゲンスポンジの重量を測定した。
- ②コラーゲンスポンジを1mlの4 % NaHCO₃(pH9)に入れた。
- ③0.5%TNBS溶液を1ml添加した。
- ④40℃で2時間、反応させた。
- ⑤反応液を100 μ l取り、ミQ水900 μ lで希釈した。
- ⑥345 nmの吸光度を測定した。

(5) 安定性評価(BCA法)

- ①架橋したコラーゲンスポンジの重量を測定した。
- ②37℃に温めたPBS(-)を2ml添加し37℃で静置した。
- ③2時間、3日、7日、14日後の上清500 μ lを回収した。
- ④BCAアッセイ溶液(BCA reagent A50mlとBCA reagent B1ml)を調製した。
- ⑤スタンダードまたはサンプル100 μ lと④の混合液1mlを

混合し、ボルテックスした。

⑥37℃で30分静置した。

⑦562nmの吸光度を測定した。

3.2. 結果と考察

(1) 架橋率測定

コラーゲンは分子側鎖にあるアミノ基との間に架橋が形成される。従って、架橋が導入されるとコラーゲン中のフリーアミノ基量が減少する。そこで、架橋したコラーゲンのフリーアミノ基量をTNBS法で測定し、次式によってコラーゲンの架橋率をフリーアミノ基の減少率で評価した。架橋率の結果を図4に示した。

架橋率(%)

$$=1-(\text{吸光度}_{345\text{nm}}/\text{スポンジ重量})_{\text{サンプル}}/(\text{吸光度}_{345\text{nm}}/\text{スポンジ重量})_{\text{未架橋}}$$

GA架橋は2時間、EGDE架橋は24時間、EDC架橋は48時間で架橋率が約40%で一定になった。また、DHT架橋では約10%までしか架橋されなかった。架橋剤を用いないDHT架橋は架橋点が少ないために、化学架橋よりも低い架橋率になったと推定される。

これらの結果から、本研究ではそれぞれの架橋時間をGAは2時間、EGDEは24時間、EDCは48時間、DHTは72時間と決定した。

(2) 安定性評価

架橋したSCスポンジの安定性を評価するために、PBS(-)に対する溶解度を測定した。溶解度はBCA法によって溶解したコラーゲンタンパク量を測定し次式によって求めた。結果を図5に示した。

溶解度(%)

$$=1-(\text{コラーゲンタンパク量})_{\text{サンプル}}/(\text{コラーゲンタンパク量})_{\text{未架橋}}$$

GA、EDC架橋したSCスポンジは、浸漬14日目においても溶解度が非常に低く、安定性が非常に高かった。一方、EGDE、DHT架橋したSCスポンジは浸漬3日目において溶解度はすでに10%であった。さらに、浸漬14日目ではいずれも40%近くの溶解度を示し、安定性が低いことがわかった。

EGDEは架橋率が40%と高かったが、溶解度は高かった。これは浸漬中に架橋結合が分解していることを示唆している。また、DHTは架橋率が10%と低いため、溶解度が高くなったと推定される。

3.3. 結論

GAおよびEDC架橋によって、PBS(-)浸漬後14日目でも溶解度の低い、安定なSCスポンジを作成することができた。一方で、EGDEおよびDHT架橋では、PBS(-)浸漬後14日目でも溶解度が約40%に達しており、十分な安定化はできなかった。

第4章 ポアサイズの影響

本研究は人工歯根材料として、多孔性のコラーゲンスポンジを使用することを目的としている。多孔性のスポンジ内で培養された細胞は、3次的に増殖できるので*in vivo*に近い環境となり、単層培養よりも分化維持能が高く保たれていることが知られている。また、スポンジの孔の直径(ポアサイズ)によっても細胞の分化維持能が変化することも知られている。例えば、ポアサイズが細胞の直径よりも小さいと細胞がスポンジ内に浸潤できない場合や、ポアサイズが大きすぎると細胞同士の3次的な相互作用が阻害されて分化維持能が低下する場合がある。従って、スポンジを作成する際には使用する細胞に適切なポアサイズのスポンジを作成することが重要である。

ポアサイズは凍結乾燥するときの凍結温度を変化させることで調整することができる。すなわち、凍結温度が低ければ低いほど氷の結晶核が小さくなるので、ポアサイズは小さくなる。本章では凍結温度を-20℃、-70℃、-190℃で凍結乾燥したスポンジを作成し、歯周靱帯細胞(hPDL)を培養して分化維持能を評価し、適切なポアサイズの決定を行った。

4.1. 実験方法

(1) コラーゲンスポンジ作成方法

- ①0.5%鮭皮由来コラーゲン(SC)溶液を24穴プレートに1ml添加した。
- ②冷凍庫(-20℃)、デュープフリーザー(-70℃)、液体窒素(-190℃)で凍結した。
- ③1日凍結後、凍結乾燥した。

(2) SEM観察

- ①SCスポンジをイオンスパッタリング装置で金蒸着した。
- ②SEM(日立、E1010/E1020)で観察した。
- ③SEM写真から20個の孔の直径を算出しその平均値をポアサイズとした。

4.2. 結果と考察

(1) 凍結温度とポアサイズ

SEM観察から、ポアサイズは-20℃の場合は275μm、-70℃の場合は86 μm、-190℃の場合は17.6μmであった(図6)。また、架橋前後(カルボジイミド架橋)でポアサイズや多孔構造に大きな差がないことを確認した(図7)。hPDLは直径が約10~20μmである。したがって、-190℃で作成したスポンジはポアサイズが小さく、細胞培養に適切ではないと判断した。そこで、-20℃と-70℃で作成したスポンジにおけるhPDLの分化維持能を評価し、適切なポアサイズの決定を行った。

(2) 分化維持能評価の結果

結果を図8に示した。-20℃より-70℃の方がhPDLのALP活性は1.5倍程度高かった。これらの結果から、凍結温度が-70℃のポアサイズがhPDLにとって適切であ

ることがわかった。 -20°C の場合ではポアサイズが大き過ぎるために細胞同士の接着が促されず分化維持能が低くなったと予想される。以降の実験では凍結温度を -70°C とした。

第5章 架橋処理の影響

鮭皮由来コラーゲン(SC)は変性温度が約 19°C であるため、生体内温度では変性し溶解する。そのため、SCをバイオマテリアルとして使用する場合、架橋処理によって安定性を高める必要がある。架橋処理には化学架橋と物理架橋がある。本研究では、化学架橋として、グルタルアルデヒド(GA)、エチレンジクロムジグリシジルエーテル(EGDE)、水溶性カルボジイミド(EDC)を、物理架橋として熱脱水(DHT)架橋を使用した。架橋処理の影響を調べるために、それぞれの方法で架橋したSCスポンジにおいて歯周細胞(hPDL)を培養し、増殖性、分化維持能を評価した。比較として、SCスポンジと同様に調製、架橋処理した牛皮革コラーゲン(BC)スポンジを使用した。架橋処理は第3章で決定した条件・時間で行った。

5.1. 細胞増殖性の結果と考察

GA、EGDE、EDC、DHT架橋したSCスポンジおよびBCスポンジのhPDLの増殖性を図9.(A)～(D)に示した。

GA架橋では、GA-SCとGA-BCの間に差はなく、ともに培養14日目まで増殖性は低かった。GAは図10のようにコラーゲンのアミノ基と反応してシッフ塩基を形成する。この反応は可逆的であるため、培養中に架橋が分解し毒性の強いGA分解物が放出されたことが推定される。図5から溶解度は低かったので分解物は少量であると推定されるが、GAの毒性は非常に強いので、少量の分解物が細胞毒性を誘引したと推定される。

EGDE架橋では、EGDE-SCはEGDE-BCよりも増殖性が低かった。EGDEはGAより細胞毒性の弱い架橋剤である。その結果、EGDE-BCではGA-BCよりも高い増殖性を示した。しかし、EGDE-SCはEGDE-BCよりも増殖性が低かった。この理由は、EGDE-SCスポンジの安定性が低いことに起因していると推定される。図5からEGDE架橋したSCスポンジは14日目まで約40%の溶解度を示していたので、14日目には多孔構造が崩れて細胞の足場(scaffold)として機能できなかつたと推定される。

EDC架橋では、EDC-SCとEDC-BCに差はなかった。また、SCスポンジの中ではEDC-SCの増殖性が他の架橋剤の中で最も高かった。EDCはGAより細胞毒性が弱く、GA、EGDEと異なり架橋剤であるEDCがコラーゲン分子内に残らない架橋反応である(図11)。その結果、架橋剤に起因する細胞毒性が低く、かつ図5からEDC架橋したSCスポンジは安定性が高かったのでscaffoldとしての機能を果たし、他の架橋剤よりも高い細胞増殖性を示したと推定される。また、

EDC-SCはEDC-BCと同等の細胞増殖性を示したので、EDC架橋によってSCにBCと遜色ない増殖性を付与できることがわかった。

DHT架橋は架橋剤を使用しないので細胞親和性の高い架橋法である。しかし、DHT-SCの細胞増殖性はDHT-BCよりも低かった。これは、DHT-SCの安定性が低いことに起因していると推定される。図5からDHT架橋したSCスポンジは14日目まで約40%の溶解度を示していたので、EGDE-SCと同様に14日目には多孔構造が崩れてscaffoldとして機能できなかったと推定される。

5.2. 分化維持能の結果と考察

hPDLの分化維持能を評価するために、アルカリフォスファターゼ(ALP)活性を測定した。結果を図12.(A)～(D)に示した。

GA架橋では、GA-SCとGA-BCに差はなく、ともに培養14日目までALP活性は低かった。これは、図9からいずれも細胞増殖性が低かったので、分化維持能が低下したと推定される。

EGDE架橋では、EGDE-SCとEGDE-BCに差はなく、ともに培養14日目までALP活性は低かった。EGDE-SCは図9から増殖性が低かったので分化維持能が低下したと推定されるが、EGDE-BCは増殖性が高いにもかかわらずALP活性は低かった。EGDEはGAより毒性は低いですが、培養中に分解した多量のEGDE分解産物が分化能に影響を与えたものと推定される。

EDC架橋では、14日目でEDC-SCがEDC-BCよりも高くなり、値も他の架橋剤より最も高かった。これは架橋剤による毒性をほとんど受けていないことを示唆しており、EDC架橋は他の架橋に比べて生体親和性の高い架橋方法であることが示唆された。

DHT架橋では、14日目でDHT-SCはDHT-BCよりもALP活性が低かった。DHT-SCは増殖性で考察したように、安定性が悪いいため分化維持能も低下したと推定される。

5.3. 結論

SCスポンジをEDCで架橋することで、BCと同等の細胞活性を付与でき、人工歯根材料として好適に利用可能であることが示唆された。

第6章 総括・今後の展開

近年、急速に進む高齢化の中で健康な生活の維持は難しいものとなっている。その要因のひとつとして挙げられるのが歯周病である。現在の歯周病治療法では十分な治療形態が得られず、理想的な組織再生を有する新しい治療法の確立が求められている。

本研究は、新たな歯周病治療法として人工歯根材料の開発を行った。人工歯根材料は生体吸収性高分子に組織再生を

誘導する種々のサイトカインを含有したものである。生体吸収性高分子としてコラーゲンスポンジを使用し、コラーゲンとして狂牛病などの伝染病伝播の可能性が潜在的に低い魚類由来コラーゲンを使用した。魚類由来コラーゲンは、北海道の水産資源である鮭の廃棄物(鮭皮)から抽出したコラーゲンをを用いた。

鮭皮由来コラーゲン(SC)は変性温度が低く生体内温度では変性・溶解するので、架橋処理による安定化を行った。架橋処理としてグルタルアルデヒド(GA)、エチレンジクロールジグリシジルエーテル(EGDE)、水溶性カルボジイミド(EDC)、熱脱水(DHT)架橋を使用した。その結果GAとEDC架橋したSCスポンジは安定性が高いことがわかった。

次に架橋処理したSCスポンジの細胞親和性を評価する実験を行った。細胞として歯周靱帯細胞(hPDL)を使用した。多孔性担体を培養に用いる場合、その孔の直径(ポアサイズ)の設定が細胞の分化維持に重要である。そこでまず、スポンジのポアサイズを調整する実験を行った。その結果、凍結温度の違いによりポアサイズを調整できることがわかった。次にポアサイズの異なる架橋したSCスポンジでhPDLを培養した。その結果、-70℃で調製したスポンジのポアサイズが最も分化維持能(ALP活性)が高いことがわかった。

次に、安定化したSCスポンジが従来の牛皮コラーゲン(BC)と同等の細胞親和性を持つか検討を行った。その結果、EDC架橋したSCスポンジは、同様に架橋したBCスポンジと同等の増殖性、分化維持能を示した。GA架橋は架橋剤による細胞毒性が強く、EGDEおよびDHT架橋はSCスポンジの安定性が悪く、BCスポンジより細胞活性(増殖、分化維持)が低かった。以上からSCスポンジをEDC架橋することによって、BCと同等のスポンジ安定性、細胞増殖性、分化維持能を付与できることがわかった。すなわち、EDC架橋SCスポンジは歯周靱帯細胞との親和性が高く、人工歯根材料として使用可能であることが示唆された。

本研究で人工歯根材料の孔径、形状、作成法、強度増加法、殺菌法を検討した結果、それぞれ-70℃凍結、多孔性スポンジ、凍結乾燥法、水溶性カルボジイミドによる架橋、UV照射滅菌を行うことによって、歯周靱帯細胞と親和性の高い人工歯根材料を開発することに成功した。

今後は、SCスポンジに含有したサイトカインの徐放化、*in vivo*実験による人工歯根材料の生体適合性および歯周組織再生能の検討を行うことが課題である。

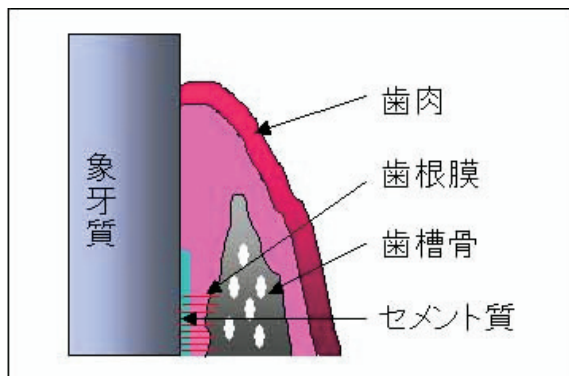


図1 歯周組織

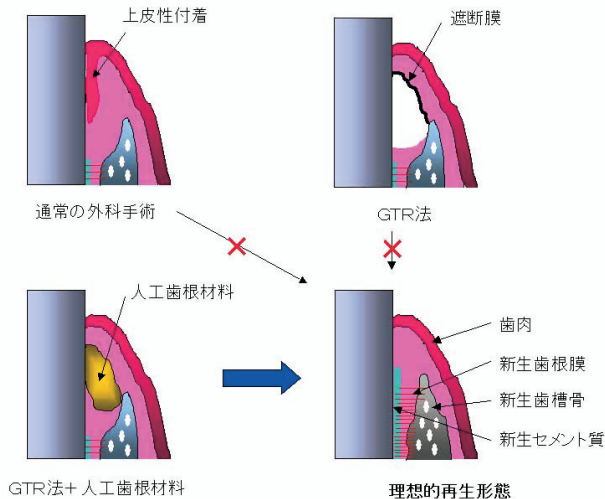


図3 歯周病治療方法と理想的な再生形態

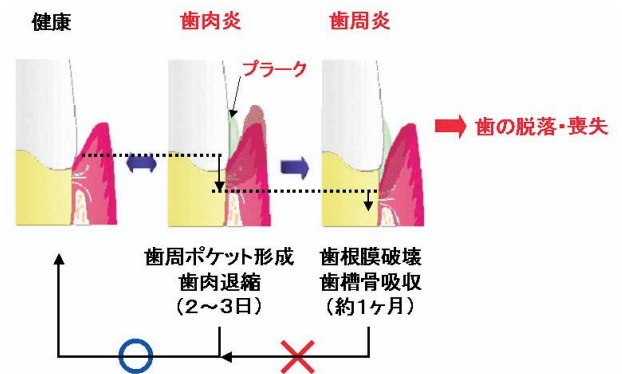


図2 歯周病の進行

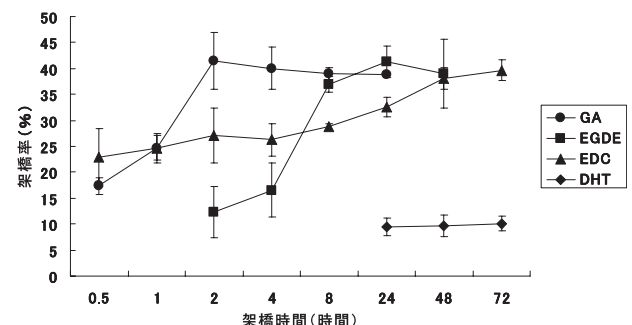


図4 架橋時間と架橋率の関係

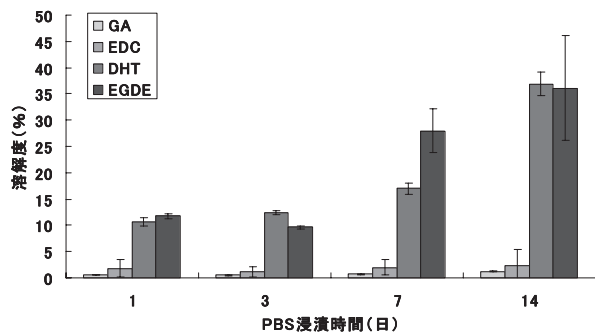


図5 溶解度の結果

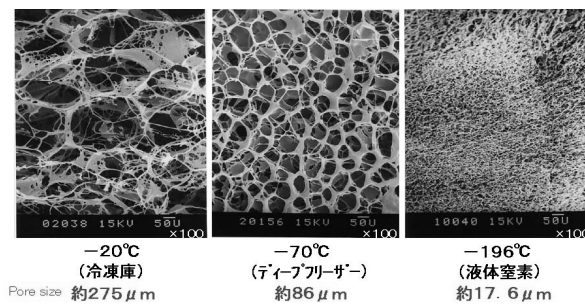


図6 架橋前の多孔構造

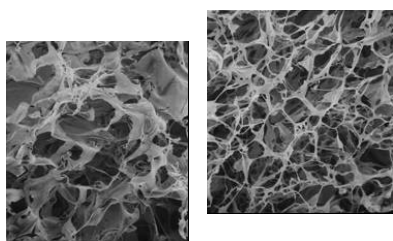


図7 架橋後の多孔構造に基づく可視化結果例

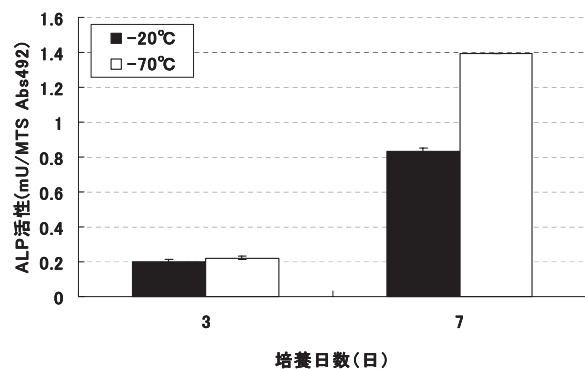


図8 ポアサイズの違いにおけるALP活性の変化

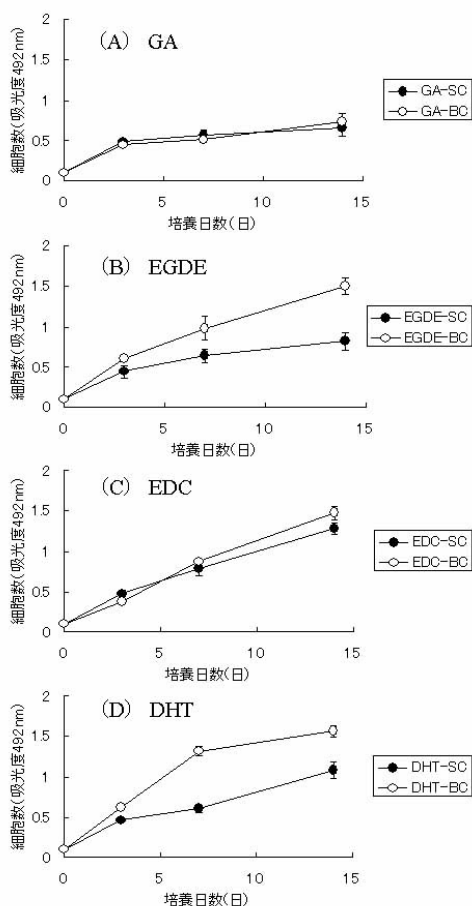


図9 hPDLの増殖性

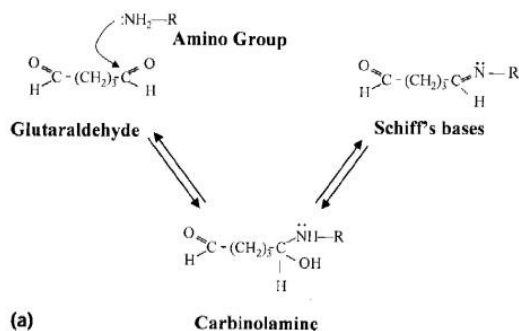
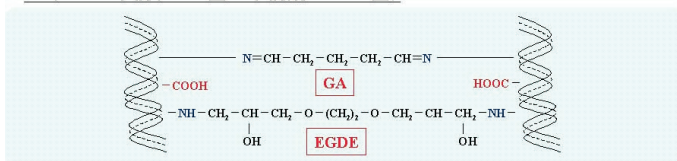


図10 GAの架橋反応

GA、EGDE架橋(アミノ基+架橋剤+アミノ基)



EDC架橋(カルボキシル基+アミノ基)

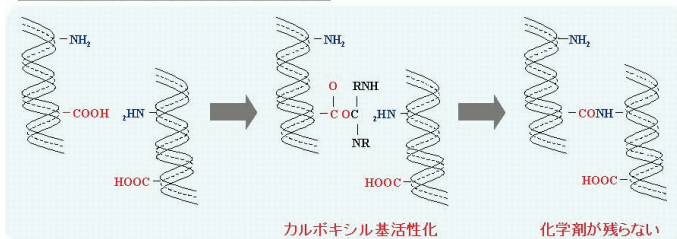


図11 架橋反応機構

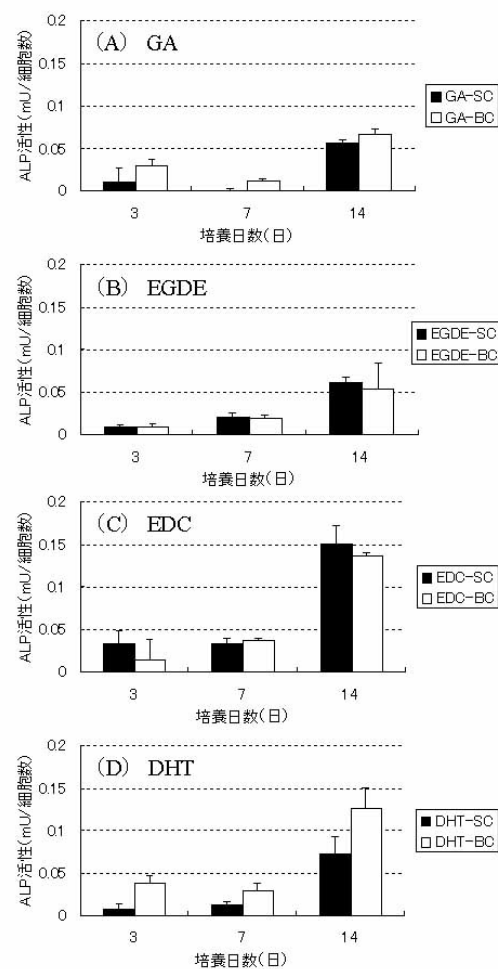


図12 hPDL細胞のALP活性図9.hPDLの増殖性