

## 2 新規代替埋入材料の開発と応用研究班

### <研究成果概要>

#### 2-1 細胞・組織応用系代替埋入材料の開発と応用研究グループ

本研究グループは硬組織形成におけるアパタイト産生細胞の活性化における諸因子を明らかにし、硬組織を構成する無機質成分の性状を明らかにし、形成促進因子を臨床へ応用することを目標としている。細胞培養系実験では加齢変化において重要な因子となっている活性酸素の影響についての問題を捉えて、種々の因子をコントロールした細胞培養実験を行った。細胞培養の結果は予想された反応を示した。

しかし、従来我々のグループが問題提起をしてきた細胞培養系における石灰化組織 (bone nodule) の質的変異について、あらためて注意深く調べる必要が出てきた。そのため、偏光顕微鏡をはじめとして、顕微 FT-IR 分析, FT-IR イメージング (FT-IRI) 解析, 微小部 X 線回折実験 (micro-XRD), 走査型電子顕微鏡観察 (SEM), エネルギー分散型元素分析 (EDS) などの手法を駆使して形成された石灰化組織の変異を追及している。

歯牙再植の研究では、種々の石灰化組織細胞の培養系を用いて、石灰化物質の沈着動態を検索した。ヒト歯髄細胞, ヒト骨髄間葉系細胞, ラット頭蓋骨由来骨芽細胞, マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1, を骨誘導培地 (デキサメタゾン, グリセロリン酸, ビタミンC, BMP を含む) で培養し, アリザリン染色, von Kossa 染色で骨結節を観察できた。そして, 失活歯根膜の歯牙再植には FGF が重要であることを見いだした。これらの実験結果から多機能性幹細胞を含む種々の培養細胞系を利用した石灰化の動態解明が可能となった。そして, 種々の石灰化組織細胞の培養細胞系での石灰化の様相は異なっており, 石灰化物成分について性状解析に有用と思われる試料を獲得でき, また, 失活歯根膜の再生を促してから歯牙再植するには FGF が重要であることを見いだせた。細胞・組織を応用した具体的な新規代替埋入材料の開発研究に必要な細胞培養実験系の準備が終了し, 歯牙再植に必要な細胞増殖因子が明らかになった。

多能性幹細胞由来アパタイト産生細胞による硬組織結晶の物理化学的性質制御の研究では, 石灰化物成分について X 線回折法による結晶性・結晶学的性質の解析, イオン解析, 元素組成分析, 石灰化物質の性状解析を行った。とくに PSPC 微小部 X 線回折装置と IP 微小部 X 線回折装置をあわせて利用することで, 従来は解析困難であった数々の結晶学的特性を明らかにすることに成功した。

歯牙再植の研究では、種々の石灰化組織細胞の培養系を用いて、石灰化物質の沈着動態を検索した。ヒト歯髄細胞, ヒト骨髄間葉系細胞, ラット頭蓋骨由来骨芽細胞, マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1, を骨誘導培地 (デキサメタゾン, グリセロリン酸, ビタミンC, BMP を含む) で培養し, アリザリン染色, von Kossa 染色で骨結節を観察できた。そして, 失活歯根膜の歯牙再植には FGF が重要であることを見いだした。これらの実験結果から多機能性幹細胞を含む種々の培養細胞系を利用した石灰化の動態解明が可能となった。そして, 種々の石灰化組織細胞の培養細胞系での石灰化の様相は異なっており, 石灰化物成分について性状解析に有用と思われる試料を獲得でき, また, 失活歯根膜の再生を促してから歯牙再植するには FGF が重要であることを見いだせた。細胞・組織を応用した具体的な新規代替埋入材料の開発研究に必要な細胞培養実験系の準備が終了し, 歯牙再植に必要な細胞増殖因子が明らかになった。そして, 歯根膜が失活した歯牙再植時に歯周組織を獲得出来るような代替材料を

開発するために歯根形成量の異なる根尖部の評価を行い、また、介在する物質として粒子径の異なる TTCP を用いた CPC 硬化物を作成し、硬化時間、引張強さ、アパタイト転化率の測定を行い、歯根膜細胞が再生し、正常にセメント質と付着し、歯槽骨と正常な関係を維持するための有用な情報がえられた。そして、種々の石灰化物形成細胞培養系で形成された骨結節の沈着動態を物理化学的な手法を導入して石灰化物の性状解析ができるようになった。とくに結晶学的特性を明らかにすることに成功したことから、硬組織中の結晶組成、組織構造を任意に、機能的により完全で最適なものへ誘導する基本的な情報がえられた。小児歯科治療において完全脱臼歯に対する処置は大変難しく、歯根吸収を起さずに維持することは大変困難であるが、粒子径の異なる TTCP を用いた CPC の応用によって解決の糸口となる情報がえられた。さらに、これまでに確立した X 線回折法による結晶性・結晶学的性質の解析、イオン解析、元素組成分析、石灰化物の性状解析法を応用して、石灰化促進モデルや老化モデルの骨形成細胞培養系を設定して石灰化物の沈着動態の検索を進めている。歯槽骨と再植歯根間に生体親和性をもち脱落歯を機能させる代替材料の実現を目指して種々の形状を有する CPC ならびにハイドロオキシアパタイトをラビット脛骨内に埋入し、病理組織学的検討に入っている。

## 2-2 機能タンパク応用系代替埋入材料の開発と応用研究グループ

歯根再建医療用人工細胞外マトリックス代替材料の開発の研究では、生体内での骨形成作用を調べる目的で、従来の報告とは異なる種々の表面処理を施した Ti インプラントの埋入動物実験を行っている。表面の性状の違いにより骨の形成パターンには明瞭な違いが認められた。ここで認められた新しく形成された骨（新生骨）について、上に述べたと同様な種々の非破壊的機器分析を行った。その結果、インプラント表面の性状（物理・化学的性質）によって形成される骨パターンと組成に明瞭な違いを認めた。

歯牙再植の成功を決定する事項には、再植歯牙の保存状態、歯根膜の状態、歯根膜の活性化等が挙げられる。再植後に歯根膜の再生・活性が認められなければ、歯根が骨に置換され、再植歯は脱落してしまう。また、根未完成歯の再植においては、歯根が成長の方向に向かうか、吸収の方向に向かうかによって再植の成否が分かると考えられる。本研究は、乳歯または永久歯の歯根膜細胞が再生し、正常にセメント質と付着し根周囲の歯槽骨との正常な関係を維持するための条件を検討することである。同時に、歯根未完成歯の歯冠・歯根形態を観察し、歯根の成長様式を検討した。岡本らは、3DX を用いて歯根形態について検討を行い、歯根形態を経時的に 3 次元的に観察することが可能なことを明らかにし、長期的に再植歯の成長過程を観察できる可能性を明らかにしており、さらに、荒井らは多孔質アパタイトが炎症症状の少ない状態で、骨への置換が起こることを報告した。このことは、骨欠損部位において骨量を増加させながら、再植を行える可能性が考えられた。

FN プラスチックシャーレにコーティングし、対照としてアルブミンのみをコーティングものにヒト骨髄間葉系細胞を培養し、経時的に付着した細胞数を測定したところ、FN 付加した方が細胞の付着率が高かった。チタンの水酸基にトレシルクロライドを反応させてチタン表面にトレシル基の導入を試みたところ、鏡面チタン表面の水酸基とトレシルクロライドとの反応は定量的に進行し、FN をトレシル化チタンに固定化できた。この固定化 FN は 60 分の超音波処理によっても脱離せずチタン表面に強固に固定されていた。TGF- $\beta$ 、副甲状腺ホルモ

ン(PTH), デキサメサゾン, FGF2 および PDGF の単独効果について検討し, いずれの因子も骨芽細胞株 ROS17/2.8 細胞において BSP の mRNA 量を増加させることを明らかにした。FN は骨芽細胞への分化能をもつヒト骨髄間葉系細胞の早期付着を促進させることが明らかになった。チタン表面に FN を強固に化学的に固定する技術の開発に成功した。TGF- $\beta$ , 副甲状腺ホルモン(PTH), デキサメサゾン, FGF2 および PDGF は, ROS17/2.8 細胞の BSP の mRNA 量を増加させる成長因子として有用であることを明らかにした。骨髄間葉系幹細胞はフィブロネクチン(FN)コーティングした培養プレートによって定着が促進された。FN のチタン表面への固定化について検討し, トレシルクロリド応用により強固にかつ大量に固定化できることを明らかにした。プラズマ重合を用いたチタンへの FN の吸着能を向上させることを試み, ヘキサメチルジシロキサンを用いることで強固にかつ大量に固定化させることに成功した。Glow Discharge で NH 基をチタンプレート表面に固定し, ついでコラーゲン(COL)をクロスリンクさせることに成功し, COL+チタン上で骨芽細胞株は, 定着し, 細胞基質成分の分泌を機能的に行うことが示唆された。

骨特異遺伝子の発現に対する成長因子の作用機序の解明を試み, 骨代謝および骨再生に深く関与する TNF- $\alpha$  により, BSP の転写は抑制され, この転写の抑制効果は, 骨芽細胞の核内転写因子と遺伝子プロモーター塩基配列との結合の変化に依存することが示唆された。エムドゲイン(EMD)/アルギネートゲル/付加多孔性ハイドロキシアパタイトをウサギ大腿骨に埋植し, 骨形成への影響を組織学的に観察したところ, アパタイト周辺に線維性結合組織がより密に形成された。インプラントの保持機能を促進するレーザー医療の応用に向けて, 骨形成に対するレーザー照射の生物学的効果の機序解明に向けて, 骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞を低出力レーザー照射し, mRNA を回収し cDNA 遺伝子ライブラリーを作成し, レーザー非照射の細胞から回収した mRNA を用いて作成した遺伝子ライブラリーを新たに構築し, 遺伝子解析が終了した。

以上の研究で確認された有用な人工代替材料 COL, FN を実際にチタン材料にコーティングする技術開発を行い, 強固な固定を得ることに成功した。さらに, *in vivo* モデル実験として EMD/アルギネートゲル/付加多孔性ハイドロキシアパタイトをウサギ大腿骨に埋植し, 結合組織再生効果があることを示唆した。一方, 骨芽細胞の骨形成能の促進を図るためのアプローチとして, 骨シアロタンパク質の転写因子の分子機序を解明するとともにレーザー照射の骨形成に関する生物学的効果の解明が進展した。これらの成果から, より良好な人工代替材料の解明に向けて大きく進展できたと考える。

現在は, 蓮根状多孔質アパタイトを用い, 孔径が骨再生におよぼす影響を検討するとともに, 骨再生効果を有すタンパク質を保持するための基質材の検討やチタン表面の改質効果について検討し, COL, FN 固定化チタン表面への細胞培養試験により骨タンパク質発現の評価を行っている。レーザー照射の生物学的効果の機序解明に向けて, レーザー照射で発現が増大する遺伝子の GeneChip 解析を進めている。

### 2-3 生体親和性物質応用系代替埋入材の開発と応用研究グループ

L-Ascorbic Acid 2-[3, 4-Dihydro-2, 5, 7, 8-tetramethyl-2-(4, 8, 12-trimethyltridecyl)-2H-1benzopyran-6-yl- hydrogen phosphate] Potassium Salt (EPC-K<sub>1</sub>)の歯肉, 歯髄培養細胞に作用させ, 細胞毒性の検策を行なう細胞培養実験系を確立できた。ウシ骨粉から抽出した可溶性骨タン

パク質成分および不溶性骨タンパク質成分をそれぞれ電気泳動法で分画し、それぞれの骨タンパク質成分を20成分に分離できた。

リン酸カルシウムセメントの研究において、リン酸カルシウムセメント(CPC)粉末をDCPAおよび炭酸カルシウムと混合後、1,600°C24時間加熱後、急冷、粉碎し作製されたTTCPに数ミクロンに粉碎したDCPAを混合し作製し、この際TTCPおよびDCPAの粒子径を変化させたCPCを試作し、リン酸四カルシウム(TTCP)の焼成条件を決定することができた。そして、良質なTTCPの作成法を完成させ、またEPC-K<sub>1</sub>等の生体親和性物質を準備し、生体組織に対する有害性をモニターする生体細胞培養実験系を確立できた。異なる粒子径のTTCPを用いたCPC硬化物を作成し、硬化時間、引張強さ、アパタイト転化率の測定を行い、新知見を得たことから、歯髄組織のよりよい保存と機能回復あるいは代替材を目指して、生体親和性を持ち且つ臨床的に操作性の良い新規ハイドロキシアパタイト材料を開発することを試みた。

高い生体親和性と良好な封鎖性を有するMineral Trioxide Aggregate (MTA)の材料学的安定性と生体親和性を検索し、その結果、MTAは根管洗浄に用いられている薬剤を作用させると、表面構造に変化が現れることが分かり、材料学的な詳細な検討の必要性が提起された。vitamin C/ vitamin Eのリン酸ジエステル結合させたEPC-K<sub>1</sub>は、LPSを作用させた歯髄培養細胞が産生するIL-1 $\beta$ およびICEの遺伝子発現を減少させたことから抗炎症効果を持つことが示唆された。MTAとEPC-K<sub>1</sub>の組み合わせた新規根管剤の開発が期待される。第四リン酸カルシウム(TTCP)と第二リン酸カルシウム(DCPA)からなるリン酸カルシウムセメント(CPC)は、歯牙骨硬組織の代替充填材として極めて良好な生体親和性材料であり、その操作性、物性を向上させる事を目的とした。CPCへの1.0wt%PEF含有は、CPCの特性を保ちながら曲げ強さを改善できることが判明した。リン酸カルシウムセメント(CPC)を応用した乳歯および根未完成永久歯におけるCPC含有歯科材料を開発することを目的にTTCPおよびDCPAの粒子径を変化させたCPCの試作に成功した。そして、TTCPとDCPAを等モル比混和させたリン酸カルシウムセメント(CPC)の直接歯髄覆髄効果を病理組織学的に確認すべくビーグル犬の上下顎犬歯頰側面に5級窩洞を形成して露髄させ、CPCで直接覆髄しCPC硬化後ワンステップボンディング材にて歯面処理後、低粘度コンポジットレジンにて充填・封鎖した。対照として $\alpha$ -TCPセメント(New Apatite liner type I)を用いて直接覆髄後、1、3および6か月で屠殺して病理組織切片を作製し有用性について調査している。歯の歯牙再植についても種々の形状を有するCPCならびにハイドロオキシアパタイトをラビット脛骨内に埋入し、病理組織学的検討を進めている。これまで開発してきたMTAやEPC-K<sub>1</sub>の基礎的研究に加え、自己血から採取したplatelet rich plasma(PRP)の基礎的研究、創傷治癒促進能をもつといわれるカーボネートアパタイト、bio-active glassの実験系を設定した。新たに開発した生体親和性物質の物性、安定性、そして培養細胞実験系を応用した安全性について検討を行い、生体親和性を有し、かつ操作性のよいMTA覆髄剤が得られ、歯髄炎症を抑制可能なEPC-K<sub>1</sub>や生体親和性に富むCPC根充填剤が証明できた。

生体親和性物質応用系代替埋入材の開発と応用研究としては特に生体親和性を有するハイドロオキシアパタイト、リン酸四カルシウム(TTCP)とリン酸二カルシウムを主体とするリン酸カルシウムセメント、MTA材料を応用し硬組織の補填や硬組織形成誘導を促進し、組織の再生を促し生体の機能回復を試みならびに多くの健康象牙質を残存させる目的でより健全な歯

質を残し選択的にう蝕部位を削除できる手技の可能性の検討を目的として研究を行った。組織再生効果を有する骨補填材の開発にハイドロキシアパタイト (HA) は、優れた生体親和性を有するため、細胞の足場材料として有用である。しかし、HA 単独では骨を形成する能力(骨誘導能)がないため、骨再生に必要な増殖因子を HA 多孔体の中に保持した複合デバイスの開発が行われている。本研究では、HA 多孔体に組織増殖因子を保持した複合デバイスを開発することを目的として実験を行い、以下の成果を得た。

- ① 蓮根状に孔の空いた3種の円柱状 HA (直径 3mm $\Phi$ , 気孔径: 20 $\mu$ m, 150 $\mu$ m, 375 $\mu$ m) を高齢ウサギ大腿骨上顆骨欠損部に埋植し、HA の気孔径が新生骨の形成およびその石灰化に及ぼす影響を検討した結果、全ての HA 気孔内に新生骨の形成が認められたが、気孔径 20 $\mu$ m の気孔内に形成された新生骨の石灰化の亢進は認められなかった。しかし、気孔径が 150 $\mu$ m 以上では、新生骨の石灰化の亢進が認められ、気孔径が新生骨の石灰化に及ぼす影響を明らかにした。
- ② エムドゲイン (EMD, ブタ歯胚より抽出、精製されたエナメル基質由来タンパク) /プロピレングリコールアルジネートゲル複合体を蓮根状に孔の空いた HA 気孔内 (375 $\mu$ m) に保持してウサギ大腿骨上顆骨欠損部に埋植し、EMD が新生骨の形成に及ぼす影響を検討した結果、EMD は新生骨の形成よりむしろ、線維性結合組織の形成を促進し、線維性治癒を促進させることを明らかにした。
- ③ スポンジ状に成形した絹フィブロイン/リン酸カルシウム複合体 (FP) をウサギ大腿骨上顆骨欠損部に埋植し、FP 複合体が新生骨形成に及ぼす影響について検討した結果、FP 複合体は埋植直後から少しずつ巨細胞に貪食されて肉芽組織に置換されると同時に、新生骨が肉芽組織の内部やその周囲に形成されることを明らかにし、HA に替わり得る足場材料であることを見出した。

リン酸カルシウムセメントの歯科臨床応用への試みに関しては、リン酸カルシウムの中でも主にリン酸四カルシウム(TTCP)とリン酸二カルシウムを主体とするリン酸カルシウムセメント(CPC)を用いて歯槽骨や歯牙硬組織を再生させることを目的に行われた。歯牙硬組織に対する研究では、①CPC の物性と操作性を向上させるために TTCP の球状化に取り組んだところ、ほぼ球状の TTCP を得ることができ、これによって CPC の粉液比が 4.0 から 6.0 となり、物性の向上が期待できた。②象牙質-歯髓複合体に対する臨床応用に向けての基礎実験として、CPC を覆髓剤として用いるために象牙質接着性を有するデュアルキュアタイプ CPC の開発に取り組んだ。その結果、含水量の多い市販オールインワンボンディング材と練和することで光照射により速やかに硬化し、歯質接着性も具備できることが確認された。歯槽骨の再生に関しては、ADAF との共同研究によりビーグル犬を用いた *in vivo* の研究から次の知見が得られた。①CPC と New CPC( $\alpha$ 型三リン酸カルシウムと炭酸カルシウムの混和物)をグリセロール・ハイドロキシメチルセルロース・リン酸水素ナトリウムの3種を混和した基材で練和したプレミックスタイプとすることによって、両試料共に良好な付形性と坑溶出性を有し、高い骨伝導性により欠損部歯槽骨は6ヵ月で新生骨に置換を示すことが明らかとなった。新生骨の形成は、New CPCの方がCPCよりやや迅速であった。②歯槽骨の形成をより迅速に行うことを目的として、基材の中にさらに35wt%でマンニトール結晶物を混和したマクロサイズの空隙を有するプレミックスタイプCPCを用いた歯槽骨再生実験より、マクロサイズの空隙を持たないプレミックスタイプCPCに比べて新生骨の形成は極めて早く、約3か月

で欠損部歯槽骨は新生骨に覆われていた。これにより、骨誘導タンパクなどを使用することなく、マクロサイズの空隙を有するプレミックスタイプ CPC がより迅速に歯槽骨を再生できることが確認された。

硬組織形成誘導能を有する根管封鎖材料の開発で重要なことは、生体外から硬組織を介して組織内に対する感染を遮断することである。この刺激を遮断する材料としての条件は生体軟組織に為害性がなく、接着性があり、さらに治癒を促進する効果があることが望まれる。現在広く用いられている水酸化カルシウムでは歯質接着性がなく封鎖性がないため永久的な封鎖材料にならない。また、歯質接着性を有するレジンやセメントでは生体との親和性に疑問が残っており、炎症の完全な消退に至っていない。そこで、硬組織形成能を有する根管封鎖材料の開発を目的に、近年、生体親和性が高く、封鎖性が優れていると考えられている MTA を使用した研究を進めてきた。生体において炎症を回避し、治癒促進を行うためには、生体で発生する活性酸素の発生を抑制、消去の検索をすること、また、骨芽細胞等に対する為害作用等を検索しなければならない。活性酸素の中でも最も活性の強いヒドロキシラジカルの消去剤であり、高い抗酸化能を持つといわれている

L-Ascorbic Acid 2-[3, 4-Dihydro-2, 5, 7, 8-tetramethyl-2-(4, 8, 12-trimethyltridecyl)-2H-1benzopyran-6-yl-hydrogen Phosphate] Potassium Salt (EPC-K<sub>1</sub>)を歯に長時間作用させた場合の観察と、MTA の骨芽細胞に対する骨形成関連遺伝子発現誘導作用について検索を行うことを目的とした。また、PRP を使用した場合の骨造成について検索することも目的とした。

歯牙保存に対する代替生体材料の概念として、歯質を多く残して処置を行うことは大変重要なことである。より健全な歯質を残し選択的にう蝕部位を削除できる可能性を検討すべく、松根らは、Nd-YAG レーザーを用いた削除について検討を加えた。その結果、レーザーにて歯質を削除する条件を変化させることにより、健全歯質とう蝕歯質を選択的に削除できる可能性を報告した。さらに、生田らは、レーザー照射後の修復過程においての影響を検討したところ、健全エナメル質質にレーザーの影響が及ぶと修復材の接着強さが有意に低下することが明らかになった。また、歯髄に炎症が波及した場合より良い状態で残存歯髄もしくは歯牙を維持するために、岡本らは、新規アパタイトを直接覆髄および生活歯髄切断、未完成永久歯のアペキソゲネーシス、アペキシフィケーションへ応用し、その有用性について検討を行った。その結果、ラットの生活歯髄切断に多孔質アパタイトを用いたところ、既存の覆髄剤と比較し炎症症状も少なく良好な状態で歯髄を保護できることが確認された。

## <優れた効果があがった点>

### 2-1 細胞・組織応用系代替埋入材料の開発と応用研究グループ

*in vitro* の細胞培養系実験では、従来注目されていなかったかあるいは一様であると考えられていた形成物そのものの性状が実験条件・因子によって大きく変化することが知られた。また、細胞培養系で形成された石灰化物は“骨様結晶 bone-like crystal”と呼ばれることが多いが、実際の骨との比較検討の結果、細胞培養系で形成された bone-like crystal は結晶性も組成も骨結晶とは異なることが知られた。*in vivo* のインプラント埋入実験では、従来骨形成パターンが重視されてきたが、実験で形成された骨組織・組成・結晶に多様性が認められた。生体内実験。歯牙再植において、今回の結果より、3DX を用いることで、歯牙再植後の経時的変化を長期観察が可能であり成長様式を検討することが可能であることが明らかになった。さらに、多孔質アパタイトを用いることにより、骨欠損部位においても骨量を増しながら再植を行える可能性が明らかになった。

### 2-2 機能タンパク応用系代替埋入材料の開発と応用研究グループ

本研究では、臨床的応用できる具体的な人工代替材の開発を進めており、とくに細胞接着タンパク質を応用した人工細胞マトリックス付加代替材については、すでにチタンへの固定化法を新規に開発することに成功している。覆髄材についてもいくつかの新規性の高い材料を用いて臨床への具体的な応用を考慮した実験で有用性が確かめられた。一方、基礎研究面からも骨形成促進の機序解明を行い、新規関連遺伝子については、DNA データベースに存在する多数の遺伝子の発現量をモニターできる GeneChip 解析システムを応用して行っていることから、創薬研究、疾病の診断や予防法の開発などの研究開発にも情報を提供できると期待される。本研究成果によって口腔領域の新規人工代替材の実現が期待されるとともに歯科医学から骨代謝の新展開を発進ができるものと考えられる。

### 2-3 生体親和性物質応用系代替埋入材の開発と応用研究グループ

硬組織の再生を試みるハイドロキシアパタイト、絹フィブロイン、リン酸四カルシウム (TTCP) とリン酸二カルシウムを主体とするリン酸カルシウムセメント、MTA を用いた研究で以下のように成果が得られた。細胞の増殖・分化の足場材料となるスキヤフォールドとしては、ハイドロキシアパタイト、リン酸カルシウム、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、コラーゲンなどが用いられている。本実験に用いた絹フィブロインは、各種アミノ酸から構成されるタンパク質であるため、細胞接着性に優れ、その分解産物に毒性がなく、シート化することにより一定の機械的強度が得られるため、組織が再生されるまでその形態が維持できるなど優れた特性を有することがわかった。また、絹フィブロインは骨再生に必要な増殖因子を徐放させる基材として優れた特性を有することが明らかとなり、HA に替わり得る足場材料であることを見出した。インプラント体を歯槽骨に埋入する際、欠損状態が大きい場合は通常、自家骨移植による歯槽骨堤形成術を行った後、数ヵ月後にインプラント体の埋入手術を行う。そこで、プレミックスタイプ CPC を用いた新しい歯槽堤形成術としてビーグル犬を用いた *in vivo* の実験を企画した。つまり、大きく歯槽骨が欠損したままの状態インプラント体を埋入し、そのインプラント体周囲をプレミックスタイプ CPC で充填することによって6ヵ月後には欠損部歯槽骨が再生され、再生した新生骨とインプラント体を歯槽骨内でしっかりと結

合していることが確認された。この結果から、プレミックスタイプCPCを用いることにより、歯槽骨堤形成術とインプラント体の埋入手術を1回で行うことが可能であることが示唆された。MTAをSEM的研究から分析した結果、硬化したMTAの表面に各種溶液を作用させると、表面の構造に変化のあることが分かった。また、MTAの結晶成分はCa, Bi, Si, Fe, S, Al, Mg, Cl, Pの順に検出され象牙質初期に必要な微量元素と類似していた。MTAは置換性石灰化に適した組織環境をもたらすことが推測された。MTAをMC3T3-E1に作用させた場合、24時間以内にType I collagen, Osteocalcin, BSP mRNAが発現した。また、Proliferation Assayの結果においてもMTAの細胞障害性は認められなかった。MTAは骨芽細胞に対して細胞障害性を示さず、BSP mRNA発現と持続的なType I collagen, Osteocalcin mRNA発現を誘導し石灰化促進作用を有することが考えられた。PRPを応用した臨床症例では、骨形成を促進した可能性が考えられる結果を得た。すなわち、PRPを使用することで、石灰化の促進が考えられた。Nd-YAGレーザーを使用し、条件を変化させることによって健全歯質およびう蝕部位を選択的に削除することが可能であることが明らかになり、より歯質を多く残すことが可能であることを明らかに出来た。また、生活歯髄切断に多孔質アパタイトを用いることにより、炎症症状も少なく良好な状態で歯髄を保護できることが確認された。



## <問題点>

### 2-1 細胞・組織応用系代替埋入材料の開発と応用研究グループ

細胞培養系で形成された石灰化物の分析は試料状態および量的な制約があるため精密な分析を行うことが難しい。今後あらたな分析手法を導入することが要求される。インプラント埋入実験の成績を評価する手段と基準が確立されていないため、他の研究者との成績比較が困難である。評価法の確立が望まれる。歯牙再植において、歯牙再植のもう一つの問題点である、歯根膜の再生については、介在物質および再植時における歯根に対してのエッチング効果について検討を加えていく予定である。

### 2-2 機能タンパク応用系代替埋入材料の開発と応用研究グループ

歯根再建医療の成功は、埋入後の骨の修復過程において積極的に骨形成促進処置を行って骨内インプラントの初期固定期間を短縮させられるかが鍵となる。いかにインプラント体に周囲の骨芽細胞前駆細胞や骨芽細胞に分化する間葉系幹細胞を短時間に定着させ、増殖・分化させることが重要である。本研究では、有用なマトリックス材の開発とインプラント体への固定に成功したが、コスト面で問題が残る。今後、量産についてが課題となろう。克服方法としては、マトリックス材の機能ドメインを特定して化学合成法による量産を推進する。また歯髄代替財の有用性については、培養細胞実験系で確認できたものの、*in vivo* レベルでの長期にわたる安全性の検証が問題となる。

### 2-3 生体親和性物質応用系代替埋入材の開発と応用研究グループ

絹フィブロイン/リン酸カルシウム複合体はスポンジ状フィブロインにリン酸カルシウム粒子を分散させたものであるが、リン酸カルシウム粒子を均一に分散できず、局在化する傾向が見られ、生体組織の反応に多少のばらつきが見られた。今後、絹フィブロイン/リン酸カルシウム複合体の作製過程を再検討し、均一な複合体を得ることを検討する必要がある。本研究で使用するCPCは、米国で顔面頭蓋骨欠損に対する補填材料として認可されている。しかし、本プロジェクトの動物実験において、歯槽骨の再生に関して極めて有効な結果を得ているにもかかわらず、薬事法認可を受けていないため日本国内で使用できない状況にある。臨床応用のためには、臨床治験をおこなって更なるデータの収集と検討が必要である。また、各種濃度のEPC-K<sub>1</sub>をヒト歯の象牙質に作用させた場合、高濃度のEPC-K<sub>1</sub>を長時間象牙質に作用させた場合は、象牙質の表面に溶解するような崩壊が見られたが、過酸化水素水との混合溶液中で作用させると象牙質はほぼ崩壊した。これまでに考えられていたEPC-K<sub>1</sub>の作用とは逆に、高濃度のEPC-K<sub>1</sub>使用時においては石灰化よりもキレート反応が強く現れることが考えられた。すなわち骨破壊の起こる可能性が推測された。Nd-YAGレーザーを用いたときの修復材の検討が必要である。また、多孔質アパタイトを用いた根管充填材を用いたときの歯根の形成については今後の検討を加え、有効性を検討する必要がある。

## <研究期間終了後の展望>

多機能幹細胞を含む硬組織形成細胞の生体内で起こる環境を考慮した培養細胞実験系での石灰化物の評価法の確立。安価でかつ量産が可能な人工細胞外マトリックスタンパク質の機能ドメインペプチドの開発。簡便で安価な有用、ペプチド・タンパク質のチタン体への固定化法の確立、臨床での使用条件を考慮した操作性に有利な生体親和性代替材、歯髄組織の組織再生、炎症抑制が期待できる覆髄材等のさらなる新規開発と安全性の確認。硬組織形成の分子機序の解明、とくに骨芽細胞の分化、骨形成に関与する新規遺伝子の発見。本研究によって、人工細胞外マトリックスをコーティングする機能的インプラント体の開発に有用な、コラーゲン細胞外基質成分が有用であることが示唆され、具体的なチタンへのコーティング法も具体化できたと考えている。また、ヒト骨髄間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化誘導の過程で発現する遺伝子群の解析に成功した。今後は動物実験系での効果の判定が重要な課題になる。そこで、動物実験の研究を基盤とした研究を継続したい。今後の研究方針としては、人工細胞外マトリックスをコーティングした機能的インプラント体が実際に飛躍的な効果を生み出せるか、動物実験系を応用して確認する。再生医学とドッキングした応用を考え、未分化間葉系細胞の応用についても動物実験系で確認し、実際の臨床応用が可能になるよう研究を進展させたい。

トレシルクロリド法によって固定化できる細胞接着タンパク質の種類について検討を加え、固定化後の効果について細胞培養試験などによって評価する。また、実際の歯科用インプラントに近い形状での細胞接着タンパク質の固定化について検討する。あるいはチタンファイバーなどの3次元スキャホールドにトレシル化法で細胞接着タンパク質を固定化することを試みる。プラズマ重合で形成されたポリジメチルシロキサン薄膜についてその生物学的効果を調べる。また、ポリジメチルシロキサン薄膜に細胞接着タンパク質を吸着させた後に、生物学的特性について検討し、トレシルクロリド法との比較を行う。分子プレカーサー法は様々な形状の基材に炭酸含有亜アパタイトを形成することができる。チタンファイバーなどのポーラス体に分子プレカーサーを用いて、炭酸含有アパタイト薄膜形成を行い、ポーラス体内部まで薄膜形成可能であるか検討すると同時に、生体適合性についても検討する。

骨芽細胞様細胞に骨シアロタンパク質遺伝子プロモーターを挿入したルシフェラーゼプラスミドを導入し、複数の因子にて刺激を行う。そしてその効果を、ルシフェラーゼアッセイにて確認し、転写因子との関わりを検索する。ゲルシフトアッセイにて、核内タンパク質とプロモーター配列の結合を検索する。

## ＜研究成果の副次的効果＞

有用なマトリックス材の開発とチタンへの固定に成功し、新規覆髄材の有用性が証明されたことから、生物活性を有するインプラント体、生体親和性覆髄材の *in vivo* での有用性が本研究プロジェクトによって証明されれば特許申請を経て実用化製品が実現出来ると考えられる。食べる行為は、単に栄養摂取の問題のみならず、大切な生理的欲求の一つである。とくに高齢者にとっては、生きる上での大きな楽しみであり、高齢者を含めた国民の QOL を高めることは期待できる。また、口腔の健康は全身の健康保持に大きな影響を与えることから、本研究プロジェクトによる咀嚼機能の回復は、高齢者の全身疾患の発症を減少させることができると思われる。本研究によって、人工細胞外マトリックスをコーティングする機能的インプラント体の開発に有用な、コラーゲン細胞外基質成分が有用であることが示唆され、具体的なチタンへのコーティング法も具体化できたと考えている。また、ヒト骨髄間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化誘導の過程で発現する遺伝子群の解析に成功した。今後は動物実験系での効果の判定が重要な課題になる。そこで、動物実験の研究を基盤とした研究を継続したい。今後の研究方針としては、人工細胞外マトリックスをコーティングした機能的インプラント体が実際に飛躍的な効果を生み出せるか、動物実験系を応用して確認する。再生医学とドッキングした応用を考え、未分化間葉系細胞の応用についても動物実験系で確認し、実際の臨床応用が可能になるよう研究を進展させたい。トレスルクロリド法によって固定化できる細胞接着タンパク質の種類について検討を加え、固定化後の効果について細胞培養試験などによって評価する。また、実際の歯科用インプラントに近い形状での細胞接着タンパク質の固定化について検討する。あるいはチタンファイバーなどの3次元スキャホールドにトレスル化法で細胞接着タンパク質を固定化することを試みる。プラズマ重合で形成されたポリジメチルシロキサン薄膜についてその生物学的効果を調べる。また、ポリジメチルシロキサン薄膜に細胞接着タンパク質を吸着させた後に、生物学的特性について検討し、トレスルクロリド法との比較を行う。分子プレカーサー法は様々な形状の基材に炭酸含有亜アパタイトを形成することができる。チタンファイバーなどのポーラス体に分子プレカーサーを用いて、炭酸含有アパタイト薄膜形成を行い、ポーラス体内部まで薄膜形成可能であるか検討すると同時に、生体適合性についても検討する。骨芽細胞様細胞に骨シアロタンパク質遺伝子プロモーターを挿入したルシフェラーゼプラスミドを導入し、複数の因子にて刺激を行う。そしてその効果を、ルシフェラーゼアッセイにて確認し、転写因子との関わりを検索する。ゲルシフトアッセイにて、核内タンパク質とプロモーター配列の結合を検索する。絹フィブロインを足場材料とし、生体親和性および骨誘導性を兼ね備えた複合デバイスを開発し、その臨床応用および特許申請を検討中である。歯槽骨充填材料としてCPCを臨床使用できるように、臨床治験を行っていく予定である。さらに、CPCの臨床使用のひとつとして、MMA系レジセメントの中にTTCP, DCPAをフィラーとして混入させることによって歯質の再石灰化作用を有するセメントの特許申請に向けて準備中である。MTAの構造から波及する生体親和性があり、硬組織形成誘導能の優れた物質を開発し、その臨床応用および特許申請を検討中である。