

博士（歯学） 井 原 朝 子

学位論文題名

Preparation and characterization of collagen scaffold
coated with a nano- β -TCP dispersion for bone tissue
engineering

(ナノ β -TCPを配合した骨再生用スキャフォールドの開発)

学位論文内容の要旨

歯周組織再生には、細胞、スキャフォールド、増殖因子の三要素が重要である。再生用スキャフォールドは様々な細胞の侵入増殖および分化のために必要であり、血管構築や再生空間の確保にも役立っている。 β -TCPは、十分な強度と良好な生体親和性および骨伝導性があり、現在骨補填剤として歯科および整形外科分野で臨床応用され、その有効性が認められている。また、近年ナノバイオセラミクスが多数研究され、応用が期待されている。ナノ材料は表面積の増大などにより様々な特性が変化するため、 β -三リン酸カルシウム(TCP)をナノ粒子化して用いることで、より生体活性が高く、さらに吸収性の良好なスキャフォールドを作製できる可能性がある。一方、線維芽細胞増殖因子(FGF2)は細胞増殖や生存、遊走、分化といった幅広い生物学的機能に関わり、組織再生に関係があることが報告されており、臨床試験でもその歯周組織再生効果が認められている。したがって作製したスキャフォールドに FGF2 を併用することでより有効な組織再生効果を示す可能性がある。

本研究では、 β -TCPをナノ粒子化し、コラーゲンスponジに配合して骨再生用スキャフォールドを作製し、物性および生体親和性を評価した。また、ラットの頭蓋骨上に埋入し、その骨再生効果を組織学的に評価した。さらに、FGF2との併用による骨再生効果についても検討した。

β -TCP をナノ粒子に粉碎、コール酸ナトリウムを分散剤として β -TCP の分散液 (1wt%) を作製後、 $6 \times 6 \times 3\text{mm}$ に成形したコラーゲンスponジを 24 時間浸漬し、エタノール洗浄を行なってから凍結乾燥してナノ β -TCP/コラーゲンスキャフォールドを作製した。この時、分散液中の β -TCP 粒子の粒径を測定した。作製した β -TCP コラーゲンスキャフォールドのコラーゲン線維へのナノ TCP 粒子の付着状態を SEM、TEM-EDX にて分析した。またスキャフォールドの圧縮強度測定を行なった。さらに、MC3T3E1 細胞をナノ β -TCP/コラーゲンスキャフォールドに播種、培養し、24 時間後に固定したものを SEM 観察して細胞付着性を評価した。次に、組織学的評価を行なった。前頭部皮膚を切開剥離して $4 \times 4\text{mm}$ の範囲で decortication したラットの頭蓋骨上にナノ β -TCP/コラーゲンスキャフォールド、コラーゲンスponジ、およびそれぞれに FGF2 を含有させたものを埋植した。何も埋植しないものをコントロールとした。術後 10 日および 35 日後にラットを安楽死させ、組織を摘出、固定した。厚さ $6\mu\text{m}$ の薄切切片を作製してヘマトキシリソ・エオジン重染色およびマッソントリクローム染色を行い、光学顕微鏡下で組織学的観察および計測を行った。

その結果、分散液中のナノ β -TCP の粒径は $20\sim500\text{ nm}$ 、平均 127 nm であり、SEM 観察においてコラーゲンスponジ表面および内部への数十～数百 nm の β -TCP 粒子の分散とコラーゲン線維への付着が認められた。 β -TCP 粒子はナノサイズの一次粒子がコラーゲン線維上で凝集して二次粒子を形成していた。TEM-EDX 分析でもコラーゲン線維上に数十～数百 nm の粒子の付着を認め、原料の β -TCP 顆粒と同じ回折ピークを示した。このことから、ナノ β -TCP 配合コラーゲンスキャフォールド中に含まれている無機成分が β -TCP であることが確認された。スキャフォールドの圧縮強度はナノ β -TCP の添加によりコラーゲンスponジよりも約 2 倍に上昇した。細胞付着性試験では細胞の良好な付着と伸展を確認し、細胞親和性は良好と考えられた。埋植後 10 日目の組織学的観察において、コラーゲンスponジへの細胞侵入性は低かった。周囲及び内部への炎症性細胞浸潤は認められなかった。ナノ β -TCP/コラーゲンスキャフォールドは良好な細胞侵入が認められ、周辺への炎症性細胞

の浸潤は少なく、良好な細胞-組織親和性を有すると考えられた。 β -TCP 顆粒と思われる構造物周囲にはマクロファージの出現が認められた。コラーゲンスponジおよびナノ β -TCP スキヤフォールドに FGF2 を添加すると、細胞侵入性および新生骨形成が増大した。35 日目では、control 群は削った皮質骨部分が幼若骨で回復していたが骨増生は認められなかつた。コラーゲンスponジ群は新生骨形成が認められ、新生骨上の結合組織には細胞成分が少ないコラーゲンスponジの残存が認められた。ナノ β -TCP/コラーゲンスキヤフォールド群は新生骨形成が認められ、新生骨上の結合組織には試料の残存はほとんど認められなかつた。コラーゲンスponジおよびナノ β -TCP/コラーゲンスキヤフォールドに FGF2 を添加した群には多量の新生骨形成が認められ、試料の残存はほとんど認められなかつた。組織学的計測を行なった結果、ナノ β -TCP/コラーゲンスキヤフォールドの埋植によって新生骨高さがコントロールに比較して有意に増加した。またナノ β -TCP/コラーゲンスキヤフォールド群の試料の残留はコラーゲンスponジ群に比較して有意に少なかつた。ナノ β -TCP の添加によって骨増生とマテリアルの吸収を促進したと考えられた。さらに、コラーゲンスponジおよびナノ β -TCP/コラーゲンスキヤフォールドに FGF2 を添加した群は新生骨面積・高さがさらに増加した。FGF2 添加ナノ β -TCP/コラーゲンスキヤフォールドが最も新生骨面積が大きかつた。また、コラーゲンスponジに FGF2 を添加した群はコラーゲンスponジ群より試料の残存が有意に減少した。FGF2 との併用は骨再生療法において効果的であると考えられた。

ナノ β -TCP 粒子をコラーゲンスponジに配合したことで骨増生効果が向上したが、これは β -TCP 粒子のナノ化により溶解が促進され、局所的なカルシウム・リンイオン濃度が上昇したことや圧縮強度が増加したスキヤフォールドのスペースメイキング効果によると考えられた。また、 β -TCP の粒子の配合によりマクロファージの出現の増加が認められ、このことがコラーゲンスponジの吸収性の向上をもたらしたと考えられた。

ナノ粒子はサブミクロン粒子よりもタンパク吸着効果が高いと言われており、そのためナノ β -TCP/コラーゲンスキャフォールドに FGF2 が吸着され、併用による効果が増大した可能性が考えられた。

以上より、ナノ β -TCP コーティングはスキャフォールドの物性および生体反応性を高め、生体親和性は良好だった。ナノ β -TCP/コラーゲンスキャフォールドを頭蓋骨上に移植すると、骨増生が促進され、コラーゲンスポンジと比較して吸収性が良好であった。また、FGF2 を添加すると骨増生がさらに促進された。FGF2 との併用は骨再生療法において効果的であると考えられた。

学位論文審査の要旨

主　査　教　授　川　浪　雅　光
副　査　教　授　土　門　卓　文
副　査　教　授　網　塚　憲　生

学　位　論　文　題　名

Preparation and characterization of collagen scaffold coated with a nano- β -TCP dispersion for bone tissue engineering

(ナノ β -TCPを配合した骨再生用スキャフォールドの開発)

審査は主査、副査全員が一同に会して口頭で行なった。申請者に対して本論文の概要の説明を求めたところ、以下の内容について論述した。

再生療法においてスキャフォールドは重要な役割を持っている。骨伝導性を有する β -三リン酸カルシウム(TCP)をナノ粒子化してスキャフォールドに用いることで生体活性やマテリアルの吸収性が促進される可能性がある。そこで、ナノ β -TCP粒子を分散後にコラーゲンスponジに配合したスキャフォールドを作製し、物性、生体親和性、骨形成効果を評価した。

β -TCPをナノ粒子に粉碎後、コール酸を分散剤とした水分散液を作成した。コラーゲンスponジを分散液に浸漬後、エタノール脱水、凍結乾燥して、ナノ β -TCP/コラーゲンスキャフォールドを作製した。コラーゲン線維へのナノ β -TCP粒子の付着状態をSEM、TEM観察およびEDXにて分析した。またスキャフォールドの圧縮強度および細胞付着性を評価した。次にラットの頭蓋骨上にナノ β -TCP/コラーゲンスキャフォールド、および線維芽細胞増殖因子(FGF2, 50 μ g)含有スキャフォールドを埋植、コントロールとしてコラーゲンスponジを埋植して、術後10日および5週後に組織学的観察および計測を行った。

ナノ β -TCPの粒径は20~500nmであり、コラーゲンスponジ線維への良好な付着が認められた。スキャフォールドの圧縮強度はナノ β -TCPの添加によりコラーゲンスponジよりも約2倍に上昇した。細胞付着性試験では細胞の良好な付着と伸展を確認し、細胞親和性は良好であると考えられた。埋植後10日目の組織学的観察において、スキャフォールド周辺への炎症性細胞浸潤は少なく、良好な生体親和性を有すると考えられた。5週目では、ス

キャフォールドの埋植によって新生骨高さが有意に増加した。またスキャフォールドの残留もコラーゲンスponジに比較して少なく、ほとんど残存を認めなかった。ナノ β -TCPの添加によって骨増生とマテリアルの吸収を促進したと考えられた。さらに、FGF2を添加すると骨増生がさらに促進され、FGF2との併用は骨再生療法において効果的であると考えられた。

ナノ β -TCPの配合はスキャフォールドの物性および骨形成効果を高め、生体親和性は良好であった。

引き続き審査担当者と申請者の間で、論文内容および関連事項について質疑応答がなされた。主な質問事項は、

- (1) TEM-EDX分析の方法について
- (2) 圧縮強度分析の方法について
- (3) 病理組織学的評価の組織像について
- (4) 病理組織学的計測結果について
- (5) 歯周治療への応用について

これらの質問に対して、申請者は適切な説明によって回答し、本研究の内容を中心とした専門分野はもとより、関連分野について十分な理解と学識を有していることが確認された。本研究は、ナノ β -TCP粒子をコラーゲンスponジに配合した骨再生用スキャフォールドが有効であることを示したことが高く評価された。本研究の内容は、歯科医学の発展に十分貢献するものであり、審査担当者全員は、学位申請者が博士（歯学）の学位を授与するに値するものと認めた。