



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	A comparative study of the bioactivities of collagen scaffold coated with graphene oxide and reduced graphene oxide. [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	金山, 和泉
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第11254号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/56153
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Izumi_Kanayama_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学） 氏 名 金山 和泉

学位論文題名

A comparative study of the bioactivities of collagen scaffold coated with graphene oxide and reduced graphene oxide.

(酸化グラフェンと還元型酸化グラフェンコーティングによる
コラーゲンスキャフォールドの生体活性)

【緒言】

失われた歯周組織を再生させることは、歯科臨床において重要なテーマとなっている。Tissue Engineering は、細胞、成長因子、スキャフォールドの 3 つの構成要素を組み合わせ、正常な機能の組織や器官の再構築を図るもので、歯周再生治療への応用が期待されている。スキャフォールドとして代表的なものとしては、バイオセラミック系やポリマーマトリックス系が使われているが、近年ナノカーボン系も再生医療材料として期待されている。本研究では、1 nm 以下の厚みで機械的強度があり、最も薄い物質として知られているグラフェンに注目した。グラフェンは凝集しやすい性質を持ち、積層してグラファイトとなるため、単層状態を保つことが困難であったが、酸化グラフェン(GO)とすることで分散状態を安定して維持することが可能となった。GO は表面を官能基で修飾されており、様々な特性を持っている。高い分散性の他にも、電気絶縁性、親水性、ドラッグデリバリーが可能であることでも知られており、またそれを還元すると官能基が除去され、性質が変化し、還元型酸化グラフェン(RGO)になる。RGO は凝集性、疎水性、導電性を持っていることで知られている。

【目的】

本研究では GO および RGO フィルムの生体応用を目的として、両フィルムの生物学的特性を調べ、細胞への反応を評価した。また、コラーゲンスキャフォールドを各フィルムでコーティングした場合の特性変化を評価した。

【材料と方法】

GO 分散液(1wt%, nanoGRAX)で培養用ディッシュをコーティング後、乾燥して GO フィルムとした。また、GO フィルムの化学的還元処理を行い RGO フィルムとした。還元処理には 10%アスコルビン酸溶液と 2%ハイドロサルファイドナトリウム溶液を用いた。コントロールは何もコーティングしていないディッシュとした。GO および RGO フィルムの特性として、SEM 観察、電気抵抗率の計測、XRD 分析、対水接触角の計測、および FBS に 1, 3, 7 日間浸漬したカルシウムの吸着試験を行った。生物学的特性の評価として、それぞれのフィルムに MC3T3-E1 細胞を播種、1 日後の SEM 観察、7, 14 日後の DNA 量および ALP 活性を測定した。次にコラーゲンスキャフォールドを GO と RGO でコーティングした。各スキャフォールドの気孔率を算出、SEM 観察、圧縮強度の測定を行い、ラット背部皮下に埋入した。10 日後にスキャフォールドを取り出して、イングロースした細胞の DNA 量を計測、また周囲組織と一塊に取り出して組織学的観察を行った。その際、各群の細胞侵入部の組織像からランダムに 3 か所選択した部位の巨細胞数をカウントし、平均数を比較分析した。

【結果と考察】

GO および RGO の SEM 観察では、フィルムのしわ様構造を認め、特に RGO フィルムで顕著であった。電気抵抗率は、GO フィルムに比較して、アスコルビン酸およびハイドロサルファイドナトリウムで還元した RGO フィルムともに電気抵抗率の低下を認め、良好な導電性を示した。XRD 分析では、GO フィルムは $8\sim 9^\circ$ にピークを認め、RGO フィルムはグラファイトと同等の回折ピークを示した。以上の結果より化学的還元処理が十分に行われたと考えられた。対水接触角の計測では、GO フィルム、RGO フィルム、コントロールの順に接触角度が低く、高い親水性を示した。細胞は適度な疎水性の方が付着に有利と考えられるので、GO フィルムよりは RGO フィルムの方が細胞付着性が高い可能性があると考えられた。カルシウム吸着試験では、RGO フィルムが GO フィルムに比べて有意に高い Ca 量を検出し、日数経過による変化はなかった。コントロールでは検出されず、GO 及び RGO フィルムは Ca を吸着する性質があることがわかった。細胞培養試験の SEM 観察において、各フィルム上に細胞の付着伸展を認めた。GO および RGO フィルム上ではコントロールに比較して伸展不良であった。DNA 量測定において、7 日目ではコントロールに比較して GO あるいは RGO フィルムで有意に少なく、60~70% 程度の量に増殖は抑制されたが、14 日目には有意差がないところまで上昇した。一方、ALP 活性測定において、7 日目では RGO フィルムが他に比べて有意に高く、14 日目では GO フィルムが有意に低く、RGO フィルムは高い傾向であった。RGO フィルムでは Ca イオン吸着が多かったこと、また、RGO は ROS の発生が GO に比較して少ないことから、ALP 活性の上昇に効果的であったと考えられた。以上から、RGO フィルムは骨芽細胞の分化レベルを上昇させる可能性があると考えられた。

一方、コラーゲンスキャフォールドの SEM 観察では、コラーゲンスキャフォールドは気孔率が 97.3%，GO あるいは RGO スキャフォールドは 96.9% で高気孔性を示した。コラーゲンスキャフォールドはコーティング処理によって表面構造が粗造に変化し、特に RGO スキャフォールドで著明だった。圧縮強度試験ではコラーゲンスキャフォールドに比較して GO コーティングで約 1.7 倍、RGO で約 2.7 倍に上昇した。これは、コラーゲンスキャフォールドの線維に GO が付着し、さらに還元処理で RGO が凝集してスポンジフォームが補強されたためと考えられた。ラット背部皮下埋入後の組織観察の結果、全ての群のスキャフォールド周囲の結合組織において、好中球やリンパ球の浸潤は認められなかった。コラーゲンスキャフォールドではスキャフォールド内部に組織の侵入は少ないことが観察されたが、GO あるいは RGO スキャフォールドでは、内部への活発な細胞のイングロース、巨細胞の出現を多く認めた。巨細胞は黒変しており、グラフェンを貪食していたと考えられた。また総 DNA 量も有意に上昇した。GO および RGO のコラーゲンスキャフォールドコーティングによる強度向上はスペースメイキング効果を高める可能性があることや、材料表面のマイクロナノ構造は細胞活性を上昇させる報告があり、本研究でもスキャフォールド表面のコーティングによる強度向上と形態変化が細胞のイングロースを向上させたと考えられた。

【結論】

GO および RGO フィルムによるコラーゲンスキャフォールドのコーティングは、特性を改善し、RGO フィルムの方がより効果的であった。