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_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士(歯学)　　氏名　金　山　和　泉

主査　教授　川　浪　雅　光
審査担当者　副査　教授　鈴　木　邦　明
副査　教授　田　村　正　人

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)

審査は主査、副査全員が一同に会して口頭で行った。初めに申請者に対して本論文の概要の説明を求め、申請者は以下の通り論述した。

Tissue Engineering の 3 つの構成要素である細胞、成長因子、スキャフォールドのうち、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のスキャフォールドとしての応用に着目した。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。本研究では GO および還元型酸化グラフェン(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。

GO 分散液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。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 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、還元した RGO フィルムは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 8～9° 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。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。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。

一方，GO あるいは RGO コーティングスキャフォールドの気孔率は 96.9%で、コラーゲンスキャフォールドの気孔率 97.3%と同程度の高気孔性を示した。SEM 観察では，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 コーティングで約 2.7 倍に上昇した。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を認めた。巨細胞も多く認めた．また総 DNA 量も有意に上昇した。

以上の結果から GO あるいは 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，スキャフォールド内部への細胞の侵入増殖を高めるなど、組織再生に応用するスキャフォールドとしての特性を改善し，RGO フィルムの方がより効果的であると考えられた。

引き続き審査者と申請者の間で、論文内容及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 粉砕したグラフェンでは分散しないのか
② グラフェンと還元型酸化グラフェンは違うのか
③ Dish にはりつけた酸化グラフェンは PBS で洗浄中などにはがれないのか
④ グラフェンシートの SEM 像でしわが強くなっているところはどういう状態なのか
⑤ XRD 分析とは何か
⑥ カルシウム吸着試験を行った理由について
⑦ ALP のより長期のデータはないのか
⑧ 気孔率の計算方法、圧縮強度の出し方について
⑨ 巨細胞はマクロファージなのか
⑩ 歯周病学の再生という見地から、本研究は何をターゲットにしているのか

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)の学位を授与されるに値するものと認めた。