



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Periodontal tissue engineering by nano beta-TCP scaffold and fibroblast growth factor 2 in 1-wall infrabony defects of dogs [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	小川, 幸佑
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第11711号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59024
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Kosuke_Ogawa_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 小 川 幸 佑

学 位 論 文 題 名

Periodontal tissue engineering by nano beta-TCP scaffold and fibroblast growth factor 2 in 1-wall infrabony defects of dogs

（ イヌ 1 壁性骨欠損におけるナノ β -TCP スキャフォールド および FGF2 を用いた Periodontal tissue engineering ）

【目的】近年、自己の細胞を利用して、歯周炎によって失われた組織の再建を図る Periodontal tissue engineering について広く研究されている。Tissue engineering には、細胞、増殖因子、スキャフォールドの三要素が重要であり、スキャフォールドは細胞の足場であると同時に再生するためのスペースを維持するために重要である。スキャフォールドの表面にナノサイズの構造を付与する事で、圧縮強度、生分解性、細胞侵入性、骨伝導性が向上する報告がある。さらに、歯周組織再生用の人工骨として用いられる β -リン酸三カルシウム (β -TCP) の粒子をナノサイズにしてコラーゲンスキャフォールドをコーティングすると、ラットの頭蓋骨において有意に骨増生を引き起こしたことが報告されている。したがってナノ β -TCP/コラーゲンスキャフォールドは Periodontal tissue engineering においても有効である可能性が考えられる。一方、線維芽細胞増殖因子 (FGF2) は創傷治癒に関する細胞の増殖、遊走、分化を促進し、また血管新生や骨形成を促進して、歯周組織の再生に有効であると報告されている。本研究では、コラーゲンスキャフォールドをナノ β -TCP でコーティングした歯周組織再生用スキャフォールドを作製し、FGF2 と併用して、イヌ 1 壁性骨欠損モデルへ埋植した場合の歯周組織再生について検討した。

【材料と方法】 β -TCP（富田製薬）をナノサイズ（平均 84nm）に粉砕し、溶媒に N-メチルピロリドンを用い、コール酸ナトリウム (0.2wt%) を分散剤として分散させ、ナノ β -TCP の分散液 (1wt%) を作成した。コラーゲンスキャフォールド (6×6×3mm, テルダーミス, オリンパステルモバイオマテリアル) をナノ β -TCP 分散液に浸漬した後、エタノールで洗浄して、ナノ β -TCP スキャフォールドとした。はじめにスキャフォールドの特性評価を行った。SEM によりスキャフォールドの形態、微細構造の観察を行い、圧縮強度、気孔率を測定した。細胞親和性の評価として、ナノ β -TCP スキャフォールドおよびコラーゲンスキャフォールドに 1 万個の MC3T3E1 細胞を播種、培養して、24 時間後に SEM 観察を行った。また培養 24 時間後、72 時間後に Cell counting kit-8 (Dojindo lab) を用いてプロリフェレーションアッセイを行った。生体親和性、細胞や組織の侵入性の評価として、ラット背部皮下埋植実験を行った。実験群としてナノ β -TCP スキャフォールド、および FGF2 (50 μ g/pcs, KCB-1D, 科研製薬) 含有ナノ β -TCP スキャフォールド、対

照群としてコラーゲンスキャフォールドをラット背部皮下に埋植した。10 日後に安楽死させ、薄切標本を作製し、ヘマトキシリン・エオジン重染色を行って光学顕微鏡下で観察した。また、DNA quantity kit (Primary cell)を用いて、取り出したスキャフォールドの DNA 量の測定を行った。

次に、イヌ 1 壁性歯周組織欠損モデルにおける歯周組織再生効果の評価を行った。イヌ下顎前臼歯に 1 壁性骨欠損（幅 3mm，高さ 5mm）を作製して、露出根面をルートプレーニング後、EDTA で処理した。その後、各群のスキャフォールドを埋入した。4 週後に安楽死させ、薄切標本を作製し、ヘマトキシリン・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観察した。また新生骨高さ、新生骨面積、セメント質様組織、線維性結合組織について計測を行い、統計学的分析を行った。

【結果】SEM にてナノ β -TCP 粒子がスキャフォールドのコラーゲン線維に付着している様子が観察された。ナノ β -TCP スキャフォールドはコラーゲンスポンジと比較し圧縮強度が有意に大きく、ナノ β -TCP コーティングによる気孔率の低下は認めなかった。細胞付着性試験において、スキャフォールド表面に MC3T3E1 細胞が良好に付着、伸展しているのを認め、プロリフェレーションアッセイでは、24 時間後、72 時間後ともにコラーゲンスキャフォールドと比較してナノ β -TCP スキャフォールドにおいて有意に大きい値となった。ラット背部皮下埋植実験において、ナノ β -TCP コーティングにより線維芽細胞やマクロファージのイングロースは増加した。また FGF2 を併用することによりイングロースはさらに増加し、活発な血管形成を認めた。イヌ 1 壁性骨欠損埋植実験において、コントロール群では、骨やセメント質様硬組織の形成は根尖側に限局し、著しい歯肉退縮を認めた。ナノ β -TCP スキャフォールド群では、骨やセメント質様硬組織などの歯周組織の形成量が増加し、歯肉退縮を抑制した。FGF2 併用群では歯周組織形成量が最大となった。いずれの群においても、病的歯根吸収やアンキローシスは認めなかった。

【考察】本研究において *in vitro* および *in vivo* において、ナノ β -TCP でコーティングする事により、コラーゲンスキャフォールド単体に比較して細胞の増殖、組織のイングロースが増加した。通常、細胞とマテリアルが面する部位の形態は細胞の反応に強く影響を与え、さらにナノ構造化は、細胞を付着させ、シグナル分子の吸着を増加させる。したがってこのようにナノマテリアルを応用したスキャフォールドは増殖因子など、組織治癒に必要なタンパクを再生スペースに保持できる可能性があるため組織治癒に有益であろう。本研究においても、ナノ β -TCP 粒子によるナノ構造が、細胞活性を向上させたと考えられた。FGF2 を併用すると細胞や血管のイングロースはさらに向上し、スキャフォールド内に FGF2 が保持されて、細胞の増殖や分化、血管形成などの生体反応を刺激したと考えられた。

Periodontal tissue engineering において、スキャフォールドには再生スペースを維持するための十分な機械的強度が必要であるが、一般的に強度を向上させると気孔率が低下することが多い。しかし、SEM 観察でみられるように、本研究ではコ

ラーゲンスキャフォールドのスポンジ構造の空隙を埋めることなく分散されたナノ β -TCP でコーティングする事により、気孔率を低下させることなく圧縮強度が有意に向上した。このことが、スキャフォールド内への細胞や血管のイングロースに有利に働いたと考えられた。

本研究においてナノ β -TCP スキャフォールドはイヌ 1 壁性骨欠損モデルにおいて歯肉退縮を抑制し、歯周組織の形成を促進した。Periodontal tissue engineering のためのスキャフォールドの特性として、再生の場合への歯肉上皮結合組織の陥入を防ぐという役割がある。ナノ β -TCP スキャフォールドは、圧縮強度の向上に加え、ラット背部皮下実験から考えるに、歯周組織においても早期に周囲から組織がイングロースして強度がさらに向上したことが、術後の歯肉弁の欠損側への陥入に抵抗して再生スペースの維持に働いたと考えられた。さらに FGF2 を併用すると、4 週間後には歯周組織の形成量が最大となり、FGF2 は歯周組織形成をさらに高めることが明らかになった。FGF2 が歯周組織再生を促進するメカニズムには、未成熟な歯根膜細胞の増殖を刺激することや強力な血管新生作用を有することが、創傷治癒に適した環境をつくる事、骨芽細胞の増殖を刺激し、骨増生を刺激することなどが考えられている。本実験より、ナノ β -TCP スキャフォールドと FGF2 を併用しても、このような FGF2 のメカニズムが阻害されることなく、ナノ β -TCP スキャフォールドを単体で用いた場合に比べて歯周組織形成をさらに増加させたものと考えられた。

【結論】ナノ β -TCP スキャフォールドと FGF2 の併用は Periodontal tissue engineering に有効であることが示された。