HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Biocompatibility and bone conductive ability dose effects of beta-TCP nanoparticles applied on 3D scaffold. [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	村上, 秀輔
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第12159号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/62184
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Shusuke_Murakami_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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　村　上　秀　輔

学　位　論　文　題　名

Biocompatibility and bone conductive ability dose effects of beta-TCP nanoparticles applied on 3D scaffold.

（　リン酸カルシウムナノ粒子含有量の違いがスキャフォールドの生物学的特性と骨伝導性に及ぼす効果　）

【目的】近年、インプラント治療のための骨増大や、歯周病などの感染症によって失われた骨組織の再建を図る目的で Bone 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物を付与する事で、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 β−三リン酸カルシウム（β-TCP）は骨伝導性に優れた吸収性セラミックであり、これまでにコラーゲンスキャフォールドを TCP ナノ粒子にてナノ構造付与することで生物学的特性が向上、骨増生や歯周組織再生を促進することを報告した。また、ハイドロキシアパタイト（HA）ナノ粒子やナノカーボンにおいて、高用量では細胞活性や生体親和性を低下させており、ナノ材料の適用量は、生体適合性に重要な役割を果たしていることが報告されている。したがってコラーゲンスキャフォールドへの TCP ナノ粒子の含有量は生体親和性や骨形成に影響を与える可能性が考えられる。そこで本研究では、TCP ナノ粒子の含有量を変えたスキャフォールドを作製し、生体親和性および骨増生効果を評価した。

【材料と方法】β-TCP 粉末（富田製薬より提供）を平均粒径 85nm に粉砕後、コール酸ナトリウム（0.2%）による孤立分散処理を行い、溶媒として N−メチルピロリドンを用いて異なる濃度のナノ β-TCP 分散液（1、5、10、25wt%）を作製した。6×6×3 mm に成形したコラーゲンスキャフォールド（テルダーミス（R)、オリンパステルモバイオマテリアルより提供）に TCP 分散液に浸漬した後、エタノールにて洗浄し、乾燥した。それぞれ TCP1、TCP5、TCP10、TCP25 とした。対照群は、コラーゲンスキャフォールド（COL）のみとした。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微細構造の観

察を行い、圧縮強度、気孔率を測定した。カルシウム（Ca）イオン溶出試験は、各スキャフォールドを 37℃で PBS 中に浸漬し、24 時間後に上清のカルシウム含有量をカルシウムテストキット（calciumE 検定、和光純薬）を用いて測定した。また酵素分解性試験は、1%コラゲナーゼタイプ I（0.1mg / ml、和光純薬）を用いた。コラゲナーゼ溶液に各スキャフォールドを 3 時間浸漬し、乾燥後、スキャフォールドの重量減少を測定した。細胞親和性の評価として、各ナノ 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 MC3T3-E1 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 1 日、3 日、5 日、7 日後に WST-8;cell counting kit-8（Dojindo lab）を用いてプロリファレーションアッセイを行った。生体親和性評価のために細胞増殖性試験およびラット皮下埋入試験を行った。実験群として TCP1、TCP5、TCP10、および TCP25、対照群として COL をラット背部皮下に埋入した。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（HE 染色）および免疫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内の DNA 量の測定を行った。次にラット頭蓋骨モデルにおける骨増生について組織学的に観察した。ラット頭蓋骨に 4×4 ㎜の骨欠損を作製、各群のスキャフォールドを埋植した。10、35 日で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、マッソントリクローム染色（MT 染色）および ALP 染色を行い光学顕微鏡下で観察した。また新生骨面積、残存試料面積について計測を行い、統計学的分析を行った。

【結果】SEM にて TCP1、TCP5 では TCP 粒子の付着によるナノ構造がコラーゲン線維表面に付着している様子が確認された。TCP10、TCP25 では内部空間に凝集した TCP 粒子を多く認めた。圧縮強度は、TCP 含有量が多いほど上昇した。気孔率はすべて 90%以上を維持した。しかし、TCP25 は、ほかの群と比べ有意に低い値を示した。Ca イオン溶出試験では、TCP 含有量が多いほど上昇した。TCP25 は他の群よりも高い値を示した。酵素分解性試験では、TCP 含有量が多いほど酵素分解に対する抵抗を増加させた。細胞親和性試験において、スキャフォールド表面に MC3T3-E1 細胞が良好に付着、伸展しているのを認め、プロリファレーションアッセイでは、TCP10 が最も良好だった。ラット背部皮下埋入試験では、TCP1、TCP5 において良好な細胞、血管のイングロースを観察したが、TCP10、TCP25 ではマクロファージ等の炎症性細胞をスキャフォールド表層に多く認めた。TCP5 の免疫染色では、スキャフォールド内部の血管内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞が多く認められた。骨増生試験において、術後 10 日では、COL はコラーゲンが圧縮されているのが確認されたのに対し、TCP1、TCP5 と TCP10 はスキャフォールドを維持することができた。また、TCP25 は、創部

の腫脹や白血球の浸潤などの、炎症所見を示した。術後 35 日では、新生骨形成は TCP10 で最も多く、MT 染色では豊富な骨基質と思われるコラーゲンを認め、ALP 染色では ALP 活性のある骨芽細胞が豊富に確認され、次いで TCP5 で多く確認された。一方 TCP25 では骨形成も少なかった。また、残存試料面積は TCP5 は COL、TCP1、TCP25 と TCP10 は TCP25 と比べ、有意に低い値を示した。

【考察】コラーゲンスキャフォールドを TCP ナノ粒子コーティングすることでスペースメイキング性能が向上した。これは本研究より TCP ナノ粒子含有量依存的に圧縮強度、コラゲナーゼ抵抗性が増加したことで、コラーゲンの安定性が向上したことが原因と考えられる。しかし、高含有量では粒子の凝集により内部空間が減少したことから、気孔率の低下をまねく可能性が示唆された。これまでにナノ粒子は生体親和性を向上させるが、粒径が大きいと炎症性サイトカインが上昇することが報告されており、本研究の TCP においてもナノ粒子化したコーティングにより、生体親和性、イングロースおよび組織置換性を向上させることが確認された。しかし、高含有量では TCP 粒子が凝集することでナノサイズ効果が失われたために、炎症性細胞浸潤が引き起こされたと考えられる。また、骨芽細胞の分化，増殖に Ca イオンが関与し、適正濃度で増加することが知られており、高濃度の Ca イオンは骨芽細胞の生存率の低下や強いマクロファージの産生を引き起こすことも報告されている。本研究においては、TCP5 や TCP10 は骨芽細胞の分化増殖や新生骨形成が多く、適切な濃度の Ca イオンが溶出されたと考えられる。しかし、TCP25 では高濃度の Ca イオンが溶出したために骨芽細胞が減少し、炎症性細胞が増殖したと思われる。

【結論】TCP ナノ粒子含有量は細胞のイングロース、およびスキャフォールドの吸収性と組織置換性に強く影響を与え、骨増生のための至適含有量が存在することが示唆された。