



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	β -三リン酸カルシウムナノ粒子配合コラーゲンスキャフォールドのイヌ抜歯窩骨形成促進効果
Author(s)	加藤, 昭人; 宮治, 裕史; 小川, 幸佑 他
Citation	日本歯科保存学雑誌, 59(4), 351-358 https://doi.org/10.11471/shikahozon.59.351
Issue Date	2016-08-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/62841
Type	journal article
File Information	Jpn. j. conserv. dent_59.pdf



β-三リン酸カルシウムナノ粒子配合コラーゲンスキャフォールドの イヌ抜歯窩骨形成促進効果

加藤昭人 宮治裕史 小川幸佑 百瀬赳人 西田絵利香

村上秀輔 吉田 崇 田中佐織 菅谷 勉 川浪雅光

北海道大学大学院歯学研究科

口腔健康科学講座 歯周・歯内療法学教室

責任著者連絡先：宮治裕史

〒060-8586 札幌市北区北 13 条西 7 丁目

北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座歯周・歯内療法学教室

TEL：011-706-4266 FAX：011-706-4334 E-mail：miyaji@den.hokudai.ac.jp

ランニングタイトル

β-TCP ナノ粒子配合スキャフォールドによる骨形成の促進

抄録

目的： β -三リン酸カルシウム (β -TCP) は骨補填材として臨床応用されているが、吸収が遅いため組織置換に時間を要することや、残留材料の汚染による不良な治癒発現の問題がある。そこでわれわれはナノ化技術を応用し、ナノサイズ化した β -TCP 粒子をコラーゲンスポンジに配合した β -TCP ナノ粒子配合コラーゲンスキャフォールドを創製した。このスキャフォールドをラット頭蓋骨に応用した研究では、骨増生効果が認められ、またコラーゲンスポンジよりもすみやかに吸収されることが報告された。そこで本研究では、 β -TCP ナノ粒子配合コラーゲンスキャフォールドをイヌ抜歯窩へ埋植して骨形成効果を評価した。

材料と方法： β -TCP 粒子（平均粒径 $2.3\mu\text{m}$ ）をナノ粒子に粉碎後、コール酸ナトリウムを分散剤として、 β -TCP の水分散液を作製した。次にコラーゲンスポンジを分散液に浸漬した後、洗浄乾燥して β -TCP スキャフォールドを作製した。ナノ粒子の付着状態を観察するために、スキャフォールド表面の SEM 観察を行った。イヌ抜歯窩埋植試験はビーグル犬の上顎第一前臼歯抜歯窩に、実験群では β -TCP ナノ粒子配合コラーゲンスキャフォールド、対照群ではコラーゲンスポンジの埋植を行い、経時的なエックス線写真撮影による評価、ならびに 2, 5 週後における組織学的評価を行った。

結果：SEM 観察においてコラーゲンスポンジ線維表面に 100nm 程度の β -TCP ナノ粒子が認められ、スポンジ内部は粒子で埋まることなく維持されていた。抜歯窩埋植試験の結果、実験群のエックス線写真では対照群と比較して不透過

性の亢進が早期に認められた．組織学的観察では，2 週の実験群で抜歯窩内に既存骨から連続する新生骨が多く認められ，スキャフォールド内部に多量の細胞や血管を観察した．一方，2 週対照群の新生骨はわずかであった．5 週の実験群では抜歯窩内に残存スキャフォールドは認められず，中心部まで新生骨を認めた．対照群 5 週では新生骨が観察されたが，一部の標本では抜歯窩中心部が結合組織と残存コラーゲンスポンジで占められていた．2 週における新生骨形成率は，実験群が対照群に比べて約 3 倍以上と有意に大きく，埋植材残存率は，実験群が有意に小さかった．

結論： β -TCP ナノ粒子配合コラーゲンスキャフォールドは良好な生体親和性，吸収性を示し，イヌ抜歯窩の骨形成を促進した．

キーワード：バイオマテリアル，骨補補填材，骨再生療法，ナノ分散技術

結 言

組織工学での 3 要素，すなわち細胞・成長因子・スキャフォールドは，人体のさまざまな組織を再生するためにこれまで広く研究されてきた¹⁾．そのなかでもスキャフォールドは，細胞の増殖・分化や血管新生，リモデリング，成長因子の保持に非常に重要である^{2,3)}．

スキャフォールドのための材料として，キトサン，フィブリン，ゼラチン，コラーゲンなどのポリマーが用いられている．なかでもコラーゲンは生体を構成する細胞外マトリクスで，スキャフォールドとして三次元構造に加工しやすく，抗原性を除去したアテロコラーゲンをを用いることで高い生体親和性，良好な生体吸収性が示され，さらに細胞の増殖促進を促すなどの生体活性促進効果が報告されている⁴⁻⁶⁾．また，コラーゲンスポンジを生体移植することで皮膚や抜歯窩の治癒促進を示し^{7,8)}，現在広く臨床応用されている．しかし広範囲な骨欠損部位に対する効果は限局的であり，さらなる改良が望まれる．

一方，骨組織の再生のために骨補填材としてリン酸カルシウムやハイドロキシアパタイト (HA)，炭酸アパタイト，バイオガラスなどのバイオセラミクスが応用されている⁹⁻¹²⁾．特に β -三リン酸カルシウム (β -TCP) は生体分解性が示され，それにより再生細胞や組織がカルシウム・リンなどの骨形成に関与する無機イオンを受け取ることが示唆されている^{13), 14)}．しかしながら， β -TCP 骨補填材の生体吸収速度は遅く，組織に置換されるまでに時間を要することが問題点

として挙げられている¹⁵⁾。ヒト脛骨へ移植された β -TCP 補填材は数カ月～数年残留することが報告されており¹⁶⁾、多量の残留 β -TCP が周囲の新生骨に取り囲まれる可能性がある。またこれまでのバイオセラミクスを用いた研究で、残留材料の露出や汚染による不良な治癒の増加が示唆されており^{17, 18)}、特に抜歯窩などの易感染性の欠損部位では早期吸収性とすみやかな組織置換が必要である。

近年のナノ技術の進歩によって、バイオセラミクス材料のナノ粒子化と分散が可能になった。ナノ粒子はサブミクロン粒子より吸収がよい¹⁹⁾、生理活性物質の吸着と生体活性の促進が起こることが報告されている^{20, 21)}。そこでわれわれは、コラーゲンの生体吸収性を損なわずに骨形成能をさらに高めるために、ナノ粒子化した β -TCP をコラーゲンスポンジに配合したスキャフォールドを開発した。このスキャフォールドを用いた研究では、骨芽細胞の増殖促進やラット頭蓋骨の増生効果を示すとともに、 β -TCP を配合しないコラーゲンスポンジよりもすみやかに吸収されることが報告された²²⁾。ゆえに、 β -TCP ナノ粒子配合コラーゲンスキャフォールドは骨再生療法に適したバイオマテリアルであると考えられる。そこで本研究では、 β -TCP ナノ粒子配合コラーゲンスキャフォールドをイヌ抜歯窩に埋植し、骨形成効果を検討した。

材料および方法

1. β -TCP ナノ粒子の作製

β -TCP 粒子粉末（平均粒径 2.3 μ m, β -第三リン酸カルシウム, 富田製薬）を高圧湿式メディアレス微粒化装置(ナノマイザー, ナノマイザー)でナノ粒子（平均粒径 127nm, 粒子径範囲 20~500nm）に粉碎し, 蒸留水中にコール酸ナトリウム (0.2wt%)を分散剤として孤立分散処理させ, β -TCP の水分散液(1wt%)を作成した. なお, 分散液の作製は無菌操作下で行った.

2. β -TCP ナノ粒子配合コラーゲンスキャフォールドの作製と特性評価

コラーゲンスポンジ（テルダーミス, オリンパス テルモ バイオマテリアル, 気孔率 97%, Fig. 1A）を 6 × 6 × 3 mm に成形して β -TCP 分散液に浸漬した後, エタノールで 3 日間回転攪拌洗浄し, 乾燥させて β -TCP ナノ粒子配合コラーゲンスキャフォールドを作製した (Fig. 1B).

また走査電子顕微鏡（SEM, S-4000, 日立製作所）を用いて, スキャフォールドの形態と微細構造の観察を行った.

3. イヌ抜歯窩埋植試験

実験動物としてビーグル犬（雌, 体重 9~10kg, 12 カ月齢）10 頭を使用した. 被験部位は上顎両側第一前臼歯とし, 計 20 部位とした. なお本実験は, 国立大学法人北海道大学動物実験委員会の承認（承認番号 第 15-0039 号）を得て, 北海道大学動物実験に関する規定に従って行った.

塩酸メデトミジン（0.1ml/kg, ドミトール, 日本全薬工業）と酒石酸ブトルファノール（0.1ml/kg, ベトルファール, Meiji Seika ファルマ）による全身麻酔とエピネフリン含有 2%塩酸リドカイン（歯科用キシロカインカートリッジ, デン

ツプライ三金)による局所麻酔を併用して、上顎第一前臼歯の抜歯を行い、実験群には β -TCP スキャフォールド、対照群にはコラーゲンスポンジを抜歯窩に埋植した (Fig. 1C)。埋植直後、埋植 1, 3, 5 週後に抜歯窩治癒経過の観察とエックス線写真撮影を行った。

2 週および 5 週の観察期間終了後に、ペントバルビタールナトリウム (0.5ml/kg, ソムノペンチル, 共立製薬) と塩酸メデトミジン (0.1ml/kg), 酒石酸ブトルファンール (0.1ml/kg) による全身麻酔下にて安楽死させ、10% 中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で灌流固定を行い、観察部位を摘出し、ホルマリン浸漬固定を 1 週間行った。次に 10% ギ酸ナトリウム溶液で 8 週間脱灰してパラフィン包埋し、通法に従い厚さ 6 μ m の頬舌的切片を作製した。その後ヘマトキシリン・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、光学顕微鏡下で病理組織学的観察を行った。

さらに、観察期間 2 週では組織学的計測を行った。組織学的計測では各部位の抜歯窩中央部の切片 1 枚を選択して、画像解析ソフト (Image J 1.41, National Institute of Health, USA) を用いて、抜歯窩面積、抜歯窩内の新生骨面積および埋植材残存面積を計測し、新生骨形成率・埋植材残存率を算出した。

4. 統計分析

実験群・対照群の平均値と標準偏差を求め、統計分析ソフト (SPSS 11.0, 日本 IBM) を用いて、有意水準 5% として Student *t* 検定を行った。

結 果

1. SEM 観察結果

β -TCP ナノ粒子配合コラーゲンスキャフォールドの観察では、100 nm 程度の β -TCP ナノ粒子がコラーゲンスポンジの線維表面に認められた。ナノ粒子の強い凝集は認められず、スポンジ内部空間は粒子によって埋まることなく十分に維持され、コラーゲンスポンジと同等に連通構造が観察された (Fig. 2)。

2. 抜歯窩の臨床的観察結果

抜歯窩の上皮化はすべての部位で良好であった。エックス線写真の比較では、実験群では抜歯窩の不透過性は 3 週後で亢進していたが、対照群では 5 週後で不透過性の亢進が認められた (Fig. 3)。

3. 組織学的観察結果

2 週の実験群では抜歯窩内に既存骨から連続する新生骨が多く認められ、同時に残存する β -TCP ナノ粒子配合コラーゲンスキャフォールドのスポンジ構造内部には多くの細胞や血管を観察した。また、残存するスキャフォールドも少なかった。一方、2 週の対照群では抜歯窩周囲既存骨から連続する新生骨はわずかであり、抜歯窩内部の一部に炎症性肉芽組織が認められた (Fig. 4)。

5 週抜歯窩の実験群では、 β -TCP ナノ粒子配合コラーゲンスキャフォールドは認められず、抜歯窩中心部まで骨梁で満たされていた。対照群では新生骨が 2 週と比較して多量に認められたが、一部の標本では抜歯窩中心部が結合組織と残

存コラーゲンスポンジで占められていた (Fig. 5).

4. 組織学的計測結果

2 週後抜歯窩の新生骨形成率は実験群で $25.1 \pm 17.9\%$ であり, 対照群の $7.6 \pm 9.9\%$ と比較して約 3 倍以上と有意に高い値であった (Fig. 6A). また埋植材残存率は, 実験群で $59.1 \pm 21.1\%$, 対照群で $81.2 \pm 14.4\%$ と, 実験群が対照群と比較して有意に小さい値であった (Fig. 6B).

考 察

本研究で用いた β -TCP 分散液には, 分散剤として胆汁酸であるコール酸ナトリウムを使用した. 一般に $200 \sim 300\text{nm}$ 以下の粒径のナノ粒子は強く凝集して本来の物性を発揮できないため, 適切な分散処理を施す必要がある²³⁾. コール酸ナトリウムは, 陰イオン界面活性剤の一種であり, β -TCP ナノ粒子に付着して自己組織化し, 水の表面張力を低下させ溶媒中に粒子を均一に分散させることができる. 本研究においても, 粒子が良好に分散された状態でコラーゲンスポンジに付着しているのが SEM にて確認され, ナノ粒子の特性が発揮できたものと考えられた.

本研究において, β -TCP ナノ粒子配合コラーゲンスキャフォールドを埋植するとコラーゲンスポンジに比較してエックス線の不透過性が亢進し, 組織学的に既存骨から連続する新生骨が多く認められ, その量は対照群の約 3 倍を示し

たことから、スキャフォールドへの β -TCP 配合によって抜歯窩の骨形成を促進したと考えられた。 β -TCP より放出されるカルシウムイオン・リン酸イオンは骨形成を促進する報告があり^{13, 24)}、Ogawa ら²⁵⁾は、 β -TCP ナノ粒子配合コラーゲンスキャフォールド上に骨芽細胞を播種、培養したところ、コラーゲンスポンジと比較して骨芽細胞の増殖が促進されたと報告している。したがって本研究の抜歯窩埋入試験においても、 β -TCP ナノ粒子によって骨芽細胞の増殖活性を促進したことが骨形成に繋がった一因と考えられる。

β -TCP などのバイオセラミクスは生体内での分解が遅く^{17, 18, 26, 27)}、 β -TCP が長期的に残留することは治癒不全のリスクとなる。しかしながら、今回の実験では β -TCP ナノ粒子配合スキャフォールドは、コラーゲンスポンジ単体と比較して 2 週目において有意に残存量が少ないことから、良好に生体吸収されたと考えられた。したがって、生体吸収性を損なわずにコラーゲンスポンジに骨形成効果を付与できたものと思われる。一般に生体材料の表面構造は接する細胞に強い影響を及ぼし、特に表面をナノ改変した生体材料は、比表面積が増大し、タンパク質吸着能を増加させることがわかっている。Woo ら²⁰⁾は、合成ナノ線維スキャフォールドが細胞接着分子であるフィブロネクチンなどのタンパク質の吸着を促進すると報告している。さらに Wei ら²¹⁾は、顆粒をナノサイズ化した HA/ポリ乳酸複合体スキャフォールドは、ミクロンサイズの HA/ポリ乳酸複合体スキャフォールドと比較して良好なタンパク吸着を示すと報告している。したがって本研究においても、ナノ β -TCP の配合によって生体活性を促進する

組織液中の成長因子がスキャフォールドに保持され、迅速な組織置換がもたらされた可能性が考えられる。また村上ら²⁸⁾は、 β -TCP ナノ粒子配合コラーゲンスキャフォールドがコラーゲンスポンジに比較して、マクロファージや線維芽細胞、血管平滑筋細胞のイングロースを促進したことを示している。スキャフォールドの血管新生効果は抜歯窩の組織像にもその傾向が認められ、血管網の早期構築によって組織形成が促進され、吸収ならびに骨形成を促進した可能性がある。

本研究で用いたスキャフォールドは、生体親和性の良いアテロコラーゲンスポンジ²⁹⁾ならびに骨補填材として広く使われている β -TCP によって構成されるバイオマテリアルである。肉眼的所見において、スキャフォールド埋入後に歯肉に強い炎症は認めなかった。また、病理組織学的観察でも 2 週においてスキャフォールドは強い炎症反応は惹起せず、5 週ではほぼ吸収され炎症所見はほとんど認められなかった。したがってスキャフォールドの良好な生体親和性が示された。同様に、 β -TCP ナノ粒子配合コラーゲンスキャフォールドをラット頭蓋骨に埋植した Ibara ら²²⁾の研究でも、良好な生体親和性が示されている。しかしながら、生体内へのナノ粒子材料の応用が細胞毒性を示した報告も数多い。これまでに、ナノサイズ化したハイドロキシアパタイトの投与によりラット腎尿管上皮に空胞変性が生じたことが報告され³⁰⁾、また、食細胞のリソソーム内に非吸収性ナノ材料の長期残留が認められた報告もある³¹⁾。ナノ粒子を含む材料の生体親和性や長期的な安全性については、今後さらに検討すべき課題であ

ろう．一方で，Ogawa ら²⁵⁾は β -TCP ナノ粒子配合コラーゲンスキャフォールドと線維芽細胞増殖因子（FGF-2）の併用実験を行い，スキャフォールドが FGF-2 を十分に吸着すること，また歯周組織の治癒を促進したことを報告している．したがって，スキャフォールドと FGF-2 を併用すれば抜歯窩の治癒をさらに促進する可能性があり，早期に骨形成とリモデリングが起こる優れたバイオマテリアルとして利用可能と考えられる．

結 論

本研究では β -TCP ナノ粒子配合コラーゲンスキャフォールドを創製してイヌ抜歯窩に埋植し，骨形成効果を検討した．その結果，スキャフォールドは良好な生体親和性・吸収性を示し，新生骨が多く観察された．以上から， β -TCP ナノ粒子配合コラーゲンスキャフォールドは，イヌ抜歯窩の骨形成を促進することが示唆された．

謝 辞

本稿を終えるにあたり，本研究の遂行にご協力を賜りました東京大学政策ビジョン研究センター 古月文志特任教授に深く感謝申し上げます．

本研究は JSPS 科研費 25463210，26870016 の助成を受けた．なお，コラーゲンスポンジ（テルダーミス）はオリンパス テルモ バイオマテリアル株式会

社， β -TCP は富田製薬株式会社より供与を受けた。

本論文に関して，開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Lenza R, Langer R, Vacanti JP. Principles of tissue engineering. 4th ed. Academic press: Cambridge; 2014. 3-8.
- 2) Chen FM, Jin Y. Periodontal tissue engineering and regeneration: current approaches and expanding opportunities. Tissue Eng Part B Rev 2010; 16: 219-255.
- 3) Hunger PM, Donius AE, Wegst UG. Structure–property–processing correlations in freeze-cast composite scaffolds. Acta Biomater 2013; 9: 6338-6348.
- 4) Shimoji S, Miyaji H, Sugaya T, Tsuji H, Hongo T, Nakatsuka M, Zaman KU, Kawanami M. Bone perforation and placement of collagen sponge facilitate bone augmentation. J Periodontol 2009; 80: 505-511.
- 5) Kato A, Miyaji H, Ishizuka R, Tokunaga K, Inoue K, Kosen Y, Yokoyama H, Sugaya T, Tanaka S, Sakagami R, Kawanami M. Combination of root surface modification with BMP-2 and collagen hydrogel scaffold implantation for periodontal healing in beagle dogs. Open Dent J 2015; 9: 52-59.
- 6) Kato A, Miyaji H, Kosen Y, Yokoyama H, Ishizuka R, Tokunaga K, Inoue K, Henmi

- M, Tanaka S, Sugaya T, Kawanami M. Periodontal healing by implantation of collagen hydrogel-sponge composite in one-wall infrabony defects in beagle dogs. J Oral Tissue Engin 2010; 8: 39-46.
- 7) 松井理佐子. 人工真皮テルダーミス・抜歯創用保護材テルプラグの開発. 再生歯誌 2008 ; 6 : 9-20.
- 8) 小西 淳, 吉本 剛. アテロコラーゲン製抜歯創用保護材 (TRE-641) の抜歯創に対する創傷治癒効果についての実験的検討. 生体材料 1998 ; 16 : 266-275.
- 9) Zheng H, Bai Y, Shih MS, Hoffmann C, Peters F, Waldner C, Hübner WD. Effect of a β -TCP collagen composite bone substitute on healing of drilled bone voids in the distal femoral condyle of rabbits. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2014; 102: 376-383.
- 10) Yuan H, van Blitterswijk CA, de Groot K, de Bruijn JD. Cross-species comparison of ectopic bone formation in biphasic calcium phosphate (BCP) and hydroxyapatite (HA) scaffolds. Tissue Eng 2006; 12: 1607-1615.
- 11) Dorozhkin SV. Calcium orthophosphate cements for biomedical application. J Mater Sci 2008; 43: 3028-3057.
- 12) Causa F, Netti PA, Ciapetti G, Baldini N, Pagani S, Martini D, Giunti A. Poly-epsilon-caprolactone/hydroxyapatite composites for bone regeneration: in vitro characterization and human osteoblast response. J Biomed Mater Res A 2006; 76:

151-162.

- 13) Xia L, Zhang Z, Chen L, Zhang W, Zeng D, Zhang X, Chang J, Jiang X. Proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells on akermanite and β -TCP bioceramics. *Eur Cell Mater* 2011; 22: 68-83.
- 14) Hong KS, Kim EC, Bang SH, Chung CH, Lee YI, Hyun JK, Lee HH, Jang JH, Kim TI, Kim HW. Bone regeneration by bioactive hybrid membrane containing FGF2 within rat calvarium. *J Biomed Mater Res A* 2010; 94: 1187-1194.
- 15) Oi Y, Ota M, Yamamoto S, Shibukawa Y, Yamada S. Beta-tricalcium phosphate and basic fibroblast growth factor combination enhances periodontal regeneration in intrabony defects in dogs. *Dent Mater J* 2009; 28: 162-169.
- 16) Gaasbeek RD, Toonen HG, van Heerwaarden RJ, Buma P. Mechanism of bone incorporation of beta-TCP bone substitute in open wedge tibial osteotomy in patients. *Biomaterials* 2005; 26: 6713-6719.
- 17) Fujita R, Yokoyama A, Kawasaki T, Kohgo T. Bone augmentation osteogenesis using hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate blocks. *J Oral Maxillofac Surg* 2003; 61: 1045-1053.
- 18) Tanaka T, Kumagae Y, Saito M, Chazono M, Komaki H, Kikuchi T, Kitasato S, Marumo K. Bone formation and resorption in patients after implantation of beta-tricalcium phosphate blocks with 60% and 75% porosity in opening-wedge high tibial osteotomy. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2008; 86: 453-459.

- 19) Zhang F, Chang J, Lin K, Lu J. Preparation, mechanical properties and in vitro degradability of wollastonite/tricalcium phosphate macroporous scaffolds from nanocomposite powders. *J Mater Sci Mater Med* 2008; 19: 167-173.
- 20) Woo KM, Chen VJ, Ma PX. Nanofibrous scaffolding architecture selectively enhances protein adsorption contributing to cell attachment. *J Biomed Mater Res A* 2003; 67: 531-537.
- 21) Wei G, Ma PX. Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2004; 25: 4749-4757.
- 22) Ibara A, Miyaji H, Fugetsu B, Nishida E, Takita H, Tanaka S, Sugaya T, Kawanami M. Osteoconductivity and biodegradability of collagen scaffold coated with nano- β -TCP and fibroblast growth factor 2. *J Nanomater* 2013; 2013: 1-11.
- 23) 神谷秀博. 微粒子液中分散の基礎概論. 色材協会誌 2013 ; 86 : 26-30.
- 24) Yuan H, De Bruijn JD, Li Y, Feng J, Yang Z, De Groot K, Zhang X. Bone formation induced by calcium phosphate ceramics in soft tissue of dogs: a comparative study between porous alpha-TCP and beta-TCP. *J Mater Sci Mater Med* 2001; 12: 7-13.
- 25) Ogawa K, Miyaji H, Kato A, Kosen Y, Momose T, Yoshida T, Nishida E, Miyata S, Murakami S, Takita H, Fugetsu B, Sugaya T, Kawanami M. Periodontal tissue engineering by nano beta-tricalcium phosphate scaffold and fibroblast growth factor-2 in one-wall infrabony defects of dogs. *J Periodontal Res* 2016; 51: in press.

- 26) Daculsi G. Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute. *Biomaterials* 1998; 19: 1473-1478.
- 27) Nie L, Chen D, Suo J, Zou P, Feng S, Yang Q, Yang S, Ye S. Physicochemical characterization and biocompatibility in vitro of biphasic calcium phosphate/polyvinyl alcohol scaffolds prepared by freeze-drying method for bone tissue engineering applications. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2012; 100: 169-176.
- 28) 村上秀輔, 宮治裕史, 西田絵利香, 川本康平, 宮田さほり, 滝田裕子, 岩永敏彦, 古月文志, 川浪雅光. 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特性に及ぼす効果. 第 37 回日本バイオマテリアル学会大会予稿集 2015 : 275, 2E-21.
- 29) 加藤勝也, 菅谷 勉, 宮治裕史, 川浪雅光. 骨髓幹細胞のスキャフォールドとして移植したスポンジ状コラーゲンの組成と濃度が骨欠損の治癒に及ぼす影響. *日歯保存誌* 2002 ; 45 : 1032-1043.
- 30) Ding T, Xue Y, Lu H, Huang Z, Sun J. Effect of particle size of hydroxyapatite nanoparticles on its biocompatibility. *IEEE Trans Nanobioscience* 2012; 11: 336-340.
- 31) Wang K, Ruan J, Song H, Zhang J, Wo Y, Guo S, Cui D. Biocompatibility of graphene oxide. *Nanoscale Res Lett* 2011; 6: 8.

Bone-forming effects of collagen scaffold containing
 β -tricalcium phosphate nanoparticles on extraction sockets in dogs

KATO Akihito, MIYAJI Hirofumi, OGAWA Kosuke, MOMOSE Takehito,
NISHIDA Erika, MURAKAMI Syusuke, YOSHIDA Takashi, TANAKA Saori,
SUGAYA Tsutomu and KAWANAMI Masamitsu

Department of Periodontology and Endodontology, Division of Oral Health Science,
Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine

Corresponding author: Dr. MIYAJI, Department of Periodontology and Endodontology,
Division of Oral Health Science, Hokkaido University Graduate School of Dental
Medicine, Kita 13, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo, 060-8586, Japan

TEL: +81-11-706-4266, FAX: +81-11-706-4334,

E-mail: miyaji@den.hokudai.ac.jp

Abstract

Purpose: Beta-tricalcium phosphate (β -TCP) exhibits biocompatibility and osteoconductivity and has been used clinically as a bone graft material. However, conventional β -TCP degrades slowly, with residual material frequently inducing aberrant healing. We therefore developed a collagen scaffold containing β -TCP nanoparticles by applying nanoscale dispersing technology. When the nano- β -TCP/collagen scaffold was implanted into rat cranial bone, its degradation and bone augmentation were remarkable when compared with collagen sponge. Accordingly, we evaluated the bone-forming effects of nano- β -TCP/collagen scaffold on extraction sockets in dogs.

Methods: β -TCP powder (average particle size: 2.3 μ m) was pulverized into nanoscale particles and dispersed into distilled water along with the surfactant sodium cholate (0.2 wt%). Collagen sponge was immersed in a dispersion (1 wt%) of β -TCP nanoparticles. This was followed by rinsing and freeze-drying to yield the nano- β -TCP/collagen scaffold. The surface of the scaffold was characterized by SEM. Subsequently, the extraction socket of a maxillary first premolar was filled with nano- β -TCP/collagen scaffold in the experimental group, while collagen sponge was applied to the socket in the control group. Radiographic images of the socket were then obtained at baseline, and at 1, 3 and 5 weeks after surgery. Histological observations were performed at 2 and 5 weeks.

Results: SEM images showed nanosized (approx. 100 nm) β -TCP particles attached to the fibers of collagen sponge. The interconnected spaces within the collagen sponge were not filled with β -TCP particles. In the experimental group, the extraction socket showed increased radiopacity when compared with the control group. Histological observation at 2 weeks revealed that new bone was present in the socket in the experimental group. In addition, ingrowth of cells and blood vessels was detected in the nano- β -TCP/collagen scaffold. In contrast, only slight new bone growth was seen in the control group. At 5 weeks in the experimental group, the scaffold had disappeared and the extraction socket was fully filled with new bone. In the control group, although new bone was detected, connective tissue and residual collagen sponge were also observed in part of the extraction socket. Newly formed bone area in the experimental group (25.1%) was significantly greater when compared with the control group (7.6%). Residual material area in the experimental group (59.1%) was significantly less when compared with the control group (81.2%).

Conclusion: Nano- β -TCP/collagen scaffold exhibited high biocompatibility and degradability. New bone formation in tooth extraction sockets of dogs was facilitated by implantation of nano- β -TCP/collagen scaffold.

Key words: biomaterial, bone graft material, bone tissue engineering, nano dispersion technology

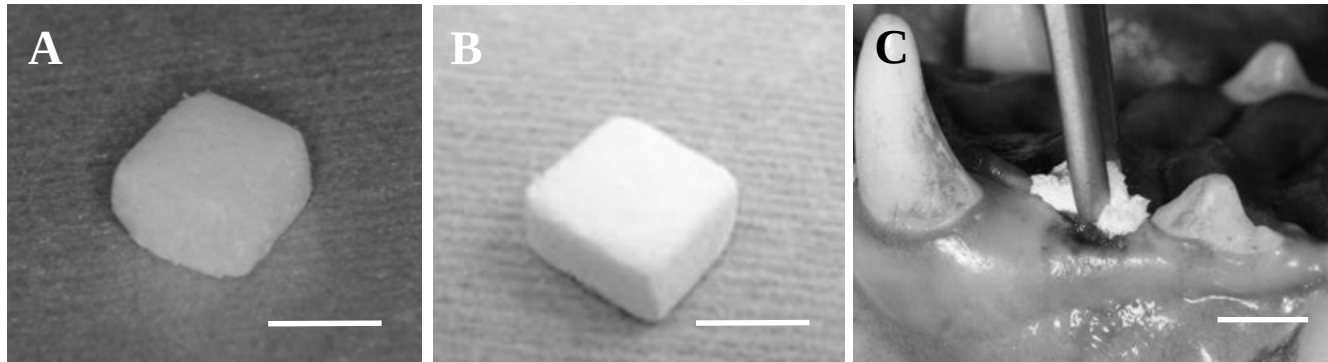


Fig. 1

(A) Collagen sponge (B) Nano- β -TCP/collagen scaffold (C) After mandibular first premolar was extracted, nano- β -TCP/collagen scaffold was implanted in the socket. Scale bars indicate 5 mm.

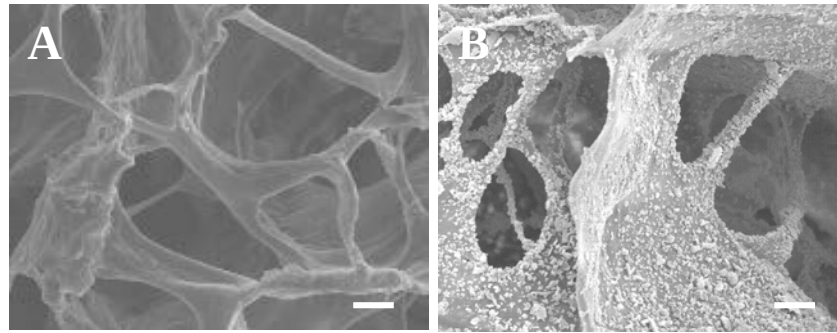


Fig. 2

(A) SEM micrograph of collagen sponge. (B) SEM micrograph of nano- β -TCP/collagen scaffold. β -TCP nanoparticles attached to the surface of strut of collagen sponge. Scale bars indicate 10 μm .

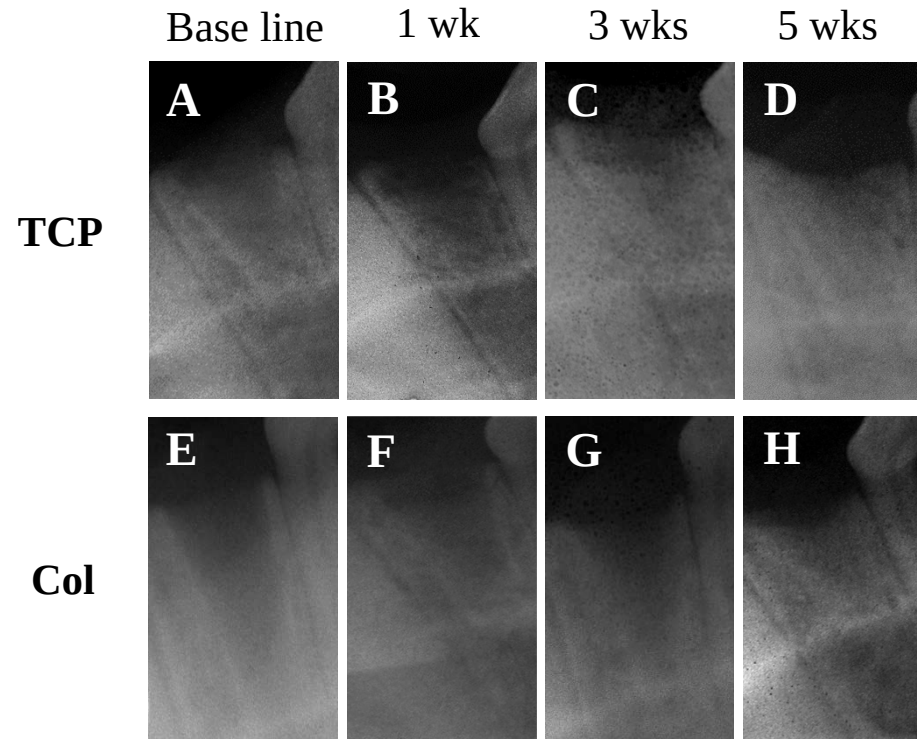


Fig. 3 Radiographic images at baseline, and at 1, 3 and 5 weeks post-surgery

(A), (B), (C), (D) Nano- β -TCP/collagen scaffold. (E), (F), (G), (H) Collagen sponge. TCP and Col indicate nano- β -TCP/collagen scaffold and collagen sponge, respectively.

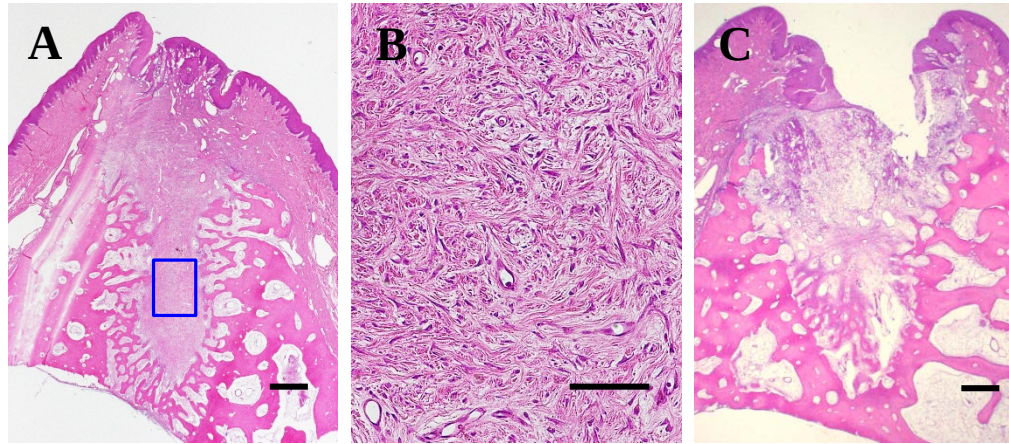


Fig. 4 Histological findings in extraction socket at 2 weeks
 (A) Specimen receiving nano- β -TCP/collagen scaffold. New bone growth was remarkable in the socket. (B) Higher magnification of framed area in panel A. Cells and blood vessels were observed in the residual scaffold. (C) Specimen receiving collagen sponge. Bone formation was slight. Scale bars indicate 1 mm (A, C) and 500 μ m (B). Staining: hematoxylin and eosin.

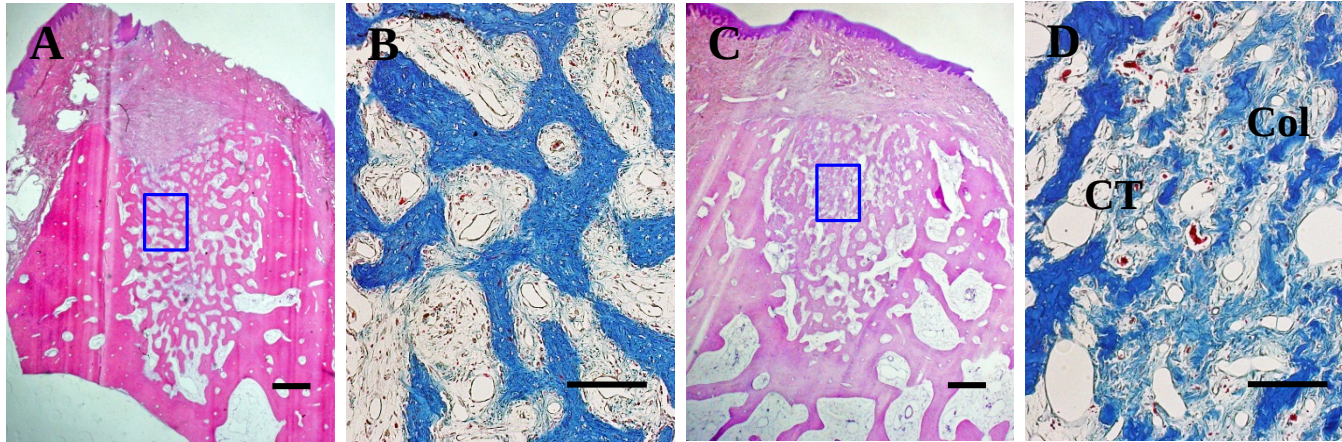


Fig. 5 Histological findings in extraction socket at 5 weeks

(A) Specimen receiving nano- β -TCP/collagen scaffold. Tooth extraction socket was filled with new bone at the central and marginal region. (B) Higher magnification of framed area in panel A. Residual scaffold was rarely noted. (C) Specimen receiving collagen sponge. New bone was observed in the socket. (D) Higher magnification of framed area in panel C. Residual collagen sponge was observed. abbreviations: Col, collagen sponge; CT, connective tissue; Scale bars indicate 1 mm (A, C) and 500 μ m (B, D). Staining: hematoxylin and eosin (A, C) and Masson's trichrome (B, D).

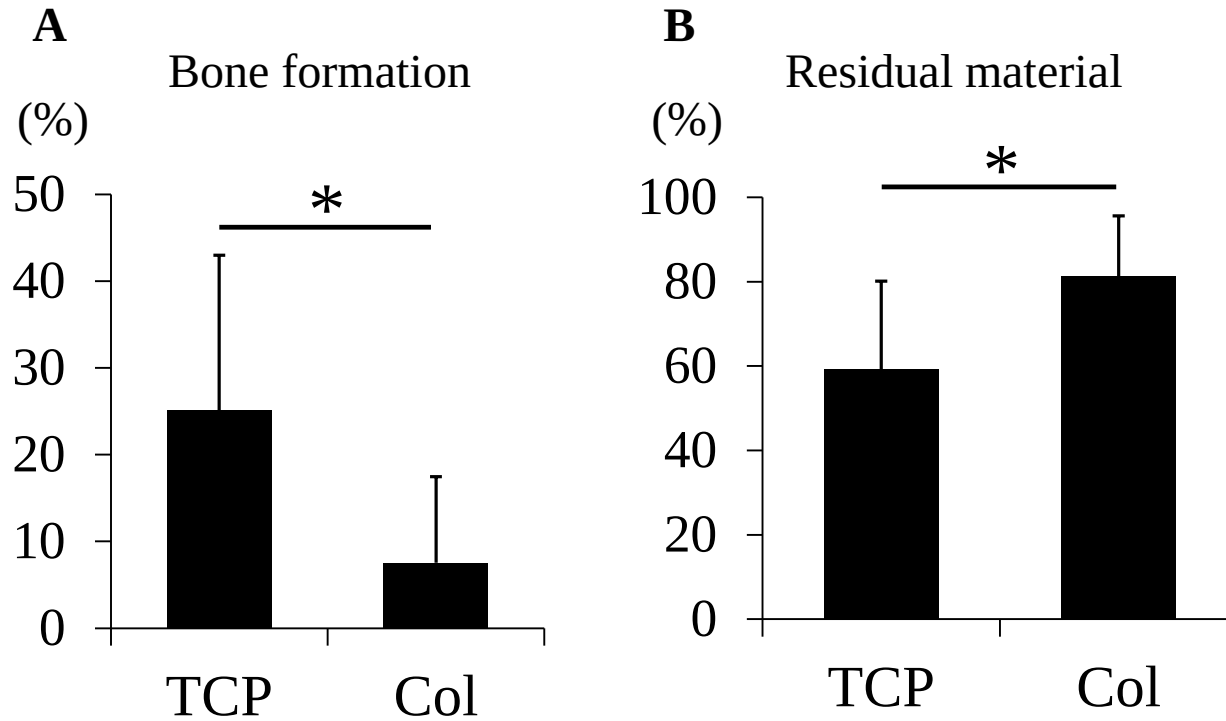


Fig. 6

(A) Histomorphometric measurements of newly formed bone area (N=7, mean $\pm$ SD).
(B) Histomorphometric measurements of residual material area (N=7, mean $\pm$ SD). TCP and Col indicate nano-β-TCP/collagen scaffold and collagen sponge, respectively. Statistical differences in each group were analyzed using Student's *t*-test, * : $p < 0.05$.