HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Characterization and evaluation of graphene oxide scaffold for periodontal wound healing of dog class II furcation [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	川本, 康平
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第12598号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65560
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Kohei_Kawamoto_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　川本　康平

学位論文題名

Characterization and evaluation of graphene oxide scaffold for periodontal wound healing of dog class II furcation

（イヌ根分岐部Ⅱ級欠損の歯周組織治癒のための酸化グラフェンスキャフォールドの特性評価）

歯周病により失われた組織の治療法として，ティッシュエンジニアリングを応用した再生療法の研究が現在行われている．我々はより良い治療効果を得るために新素材である酸化グラフェン（GO）に着目した．GO は単層カーボンシートで，これまでにタンパク質吸着性が明らかになっている．また GO とコラーゲンスキャフォールドを用いた GO スキャフォールドを作製し，ラット背部に埋植したところ良好な生体親和性が示された．しかしながら，GO スキャフォールドの骨増生効果や歯周組織に対する効果はいまだ明らかではない．そこで本研究では GO スキャフォールドの強度，毒性，ラット頭蓋骨上における骨増生効果の評価を行った．さらにイヌ根分岐部Ⅱ級骨欠損モデルへ埋植した場合の歯周組織治癒効果を検討した．

Hummers-Offeman 法により作製した GO（nanoGRAX；三菱ガス化学)を，N-メチルピロリドンにて希釈し 1 μg/mL の GO 分散液を作製した．GO スキャフォールドは，コラーゲンスキャフォールド（6×6×3 mm，テルダーミス；オリンパス テルモ バイオマテリアル）に GO 分散液を浸透させ，溶媒をエタノール系列にて除去洗浄後，乾燥させて作製し，SEM 観察，圧縮強度試験を行った．さらに，MC3T3-E1 細胞を GO スキャフォールドに播種培養し，LDH assay，WST-8 assay にて細胞親和性を評価した．

次にラット頭蓋皮質骨を 4 ㎜四方でデコルチケーションし，同部に GO スキャフォールドまたはコラーゲンスキャフォールドを埋植した．埋植後 10 日において ED-1/Ga13，P4HB，ASMA，RECA-1 の発現を観察し，埋植後 35 日に HE，ALP 及び TRAP 染色して，新生骨面積，新生骨高さ，残留試料面積を計測した．

イヌ根分岐部Ⅱ級骨欠損の実験では，メスビーグル犬の下顎第 2，3，4 前臼歯部を実験部位とし，分岐部内に高さ 5㎜，水平的深さ 3㎜ の根分岐部Ⅱ級骨欠損を作製し，骨欠損の最根尖側にノッチを付与した．作製した欠損部に GO スキャフォールドを埋植する GO 群，コラーゲンスキャフォールド群，及び非移植群をランダムに設定し， 4 週後に CT 撮影，組織学的観察及び新生骨形成率，歯根膜形成率，セメント質形成率の計測を行った．なお本動物実験は北海道大学動物実験委員会の承認（承認番号 13-0076，15-0039）を得て行った．

SEM 観察の結果，GO はコラーゲンスキャフォールド表面に薄く均一に付着していた．また，GO スキャフォールドの圧縮強度はコラーゲンスキャフォールドの約 1.7 倍であった．WST-8 assay の結果、GO スキャフォールドはコラーゲンスキャフォールドに比べてやや高く，LDH assay ではほぼ同程度の値であった．

ラット頭蓋骨へ埋植した 10 日目の免疫染色の結果，マクロファージの局在を示す ED-1/Ga13 が GO スキャフォールドおよびコラーゲンスキャフォールドの両方で確認された．しかし， P4HB，ASMA，RECA-1 陽性細胞は GO スキャフォールドにおいて顕著に局在が確認された．35 日の結果では，GO 群に骨形成が認められ，ALP 及び TRAP 陽性細胞が観察され

た．また，新生骨内部には黒点が観察された．計測の結果，新生骨面積，新生骨高さは GO スキャフォールドで有意に高い値を示し，残留スキャフォールド面積は有意に低い値を示した．

イヌ根分岐部Ⅱ級骨欠損へ埋植した結果，CT では GO スキャフォールドを埋入した分岐部内の不透過性は亢進していた．組織学的観察では， GO スキャフォールド群は分岐部内のほとんどが歯槽骨様組織で満たされており，セメント質様組織や歯根膜様組織の再生もみられた．また，歯槽骨様組織の内部には黒点が観察された．コラーゲンスキャフォールド群では再生された組織は GO スキャフォールド群に比べて少なく，分岐部中心部ではスキャフォールドの残留が観察された．非移植群ではノッチ部付近に限局して歯根膜様組織やセメント質様組織が観察された．また，分岐部歯冠側では上皮様組織やプラーク様構造物の侵入を認めた．歯槽骨形成率は GO スキャフォールド群で 70%，コラーゲンスキャフォールド群で 36%，非移植群で 14%と GO スキャフォールドは他の 2 群と比べて有意に高い値を示した．また，歯根膜形成率およびセメント質形成率も GO スキャフォールド群で有意に高い値を示した．

SEM 観察の結果，コラーゲン線維表面に GO の付着が認められ，また GO スキャフォールドの圧縮強度はコラーゲンスキャフォールドより顕著に高くなったことから，コラーゲン線維表面に GO シートが付着することで，スキャフォールドを補強したものと考えられた．さらに GO スキャフォールドに播種した MC3T3-E1 細胞の LDH 活性が，コラーゲンスキャフォールドとほぼ同じであったことから GO スキャフォールドの細胞傷害性は低いことが示唆された．

ラット埋植試験において,GO スキャフォールド埋植後,ALPase 陽性骨芽細胞及び TRAPase 陽性破骨細胞を含む新生骨が観察された．また，新生骨面積および新生骨高さは，コラーゲンスキャフォールドに比較して有意に大きかったことから，GO スキャフォールドはラット頭蓋骨の骨増生を促進すると考えられた．さらに GO スキャフォールドの残留面積が有意に小さいことから，良好な生体吸収性が示された．10 日の免疫染色で，P4HB 陽性線維芽細胞，血管形成に関連する ASMA 陽性血管平滑筋細胞および RECA-1 陽性血管内皮細胞は，GO スキャフォールド群で顕著に観察された．これらの結果から，GO スキャフォールドは，組織治癒過程における血管ネットワークの構築を刺激し，創傷治癒および骨形成が促進されたと考えられた．

イヌ根分岐部Ⅱ級骨欠損への GO スキャフォールドの埋植では，CT にて他の 2 群より分岐部内の不透過性が亢進したこと，および組織学的計測結果において歯槽骨形成率が他の 2 群と比較して有意に大きい値を示したことから，GO スキャフォールドは分岐部内の歯槽骨形成を促進したと考えられた．また GO スキャフォールドによって歯根膜形成率およびセメント質形成率が上昇したことから，これらを含めた歯周組織の再生が促進されたと考えられた．一方で新生骨様組織および歯根膜様組織の内部に黒点が観察された，これは GO が分解されず，マクロファージの食作用によって凝集したためと考えられた．ナノ材料残留の組織への影響は慎重に考える必要があるが，歯周組織および骨組織における GO の長期残留の影響は，現在まで報告されていない．解明のためにはさらなる検討が必要であると思われる．

以上をまとめると，GO スキャフォールドはラットの頭蓋骨において細胞のイングロースおよび血管新生を増強し，頭蓋骨の骨増生を促進した．また，イヌ根分岐部Ⅱ級欠損において歯周組織の治癒が促進されたことから,スキャフォールドとしての有用性が示された．