



Title	Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) 徐放用担体としてのpolyHEMA系ハイドロゲル粒子の開発
Author(s)	竹田, かほる
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59988
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	竹 田 かほる
博士の専攻分野の名称	博士 (歯学)
学 位 記 番 号	第 25788 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 25 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 歯学研究科分子病態口腔科学専攻
学 位 論 文 名	Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) 徐放用担体としての polyHEMA 系 ハイドロゲル粒子の開発
論 文 審 査 委 員	(主査) 教授 今里 聰 (副査) 教授 林 美加子 准教授 和田 孝一郎 講 師 山田 聰

論 文 内 容 の 要 旨

【研究目的】

近年、破折歯根の接着再建や逆根管充填など、歯周組織との接触部でもレジン系材料が使用されるようになりつつあることから、生体の治癒を促進する機能を備えた歯科用レジンの実現に期待が寄せられている。しかしながら、今までのところ、歯科用レジン系材料への組織再生誘導能の付与に関する研究はほとんど行われていない。

本研究では、歯科用レジンへの適用を想定したタンパク徐放用担体としての poly-hydroxyethyl methacrylate (polyHEMA) 系ハイドロゲル粒子を新規に作製し、モデルタンパクを用いてその担持および徐放能について検討した後、FGF-2 を担持させたハイドロゲル粒子を試作し、*in vitro* 系での溶出実験と細胞培養実験により、FGF-2 徐放用担体としての有用性を評価した。さらに、4-methacryloyloxyethoxy carbonylphthalic anhydride/methyl methacrylate (4-META/MMA) 系レジンの物理化学的特性が FGF-2 の活性に及ぼす影響の点から、試作した FGF-2 徐放性ハイドロゲル粒子の適用の可能性について検討を行った。

【材料および方法】

実験 I. polyHEMA 系ハイドロゲル粒子の作製とタンパク担持・徐放能の評価

HEMA に架橋性モノマーである Trimethylolpropane trimethacrylate (TMPT) を 10% の濃度で添加して加熱重合させ、粉碎した。得られたハイドロゲル粒子（平均粒径 550 μm ）を 48 時間水中浸漬して洗浄後、以下の実験に供した。

1. 吸水性の評価：ハイドロゲル粒子を水中で 4 日間攪拌保管後に重量を測定し、吸水率と含水率を算出した。
2. タンパク担持状態の観察と溶出性の検討：モデルタンパクとして Bovine serum albumin

(BSA) を用い、FITC ラベルした BSA の水溶液にハイドロゲル粒子を 24 時間浸漬した後、共焦点レーザー顕微鏡にて担持状態を観察した。また、BSA 担持ハイドロゲル粒子を 37°C 水中に浸漬し、28 日まで経時的に BSA 溶出濃度を測定した。

実験 II. FGF-2 担持ハイドロゲル粒子の評価

1. FGF-2 徐放性の検討：リコンビナントヒト FGF-2 (Fiblast, 科研製薬) を担持させたハイドロゲル粒子を 37°C 水中に浸漬し、28 日まで経時的に FGF-2 の溶出濃度を測定した。
2. 細胞培養系での効果の検討：FGF-2 担持ハイドロゲル粒子を α -MEM 培地に浸漬して 37°C 下で保管し、一定時間ごとに回収した培地を用いてマウス骨芽細胞様細胞である MC3T3-E1 細胞の培養を行い、MTT アッセイにより細胞増殖を評価した。
3. 細胞付着性の評価：FGF-2 担持ゲル粒子を α -MEM 培地に浸漬し、MC3T3-E1 細胞を播種して 3 日間培養を行った後、走査型電子顕微鏡にて細胞の付着状態を観察した。

実験 III. レジンの物理化学的特性が FGF-2 に及ぼす影響の評価

1. 重合による温度上昇の検討：4-META/MMA 系接着性レジンであるスーパー・ボンド (サンメディカル, SB) を混和後、熱電対を挿入し、室温または 37°C 下で、30 秒ごとに重合熱の発生による温度上昇を調べた。
2. 未重合モノマー溶出濃度の測定と FGF-2 の活性に及ぼす影響の検討：SB 硬化体を 37°C 水中に 24 時間浸漬し、未重合モノマーの溶出濃度を高速液体クロマトグラフィーにより測定した。得られた結果を基にして未重合モノマーを含む α -MEM 培地を調整し、FGF-2 を添加して MC3T3-E1 細胞の培養を行い、MTT アッセイと ALP 活性測定により細胞の増殖と分化を評価した。

【結果】

実験 I：試作ハイドロゲル粒子の吸水率と含水率はそれぞれ 58.3% と 36.8% であった。BSA 溶液への浸漬によりハイドロゲル粒子表層への BSA の密な吸着が生じることが確認され、同粒子からは 28 日目まで持続的な BSA の溶出が認められた。

実験 II：試作ハイドロゲル粒子に FGF-2 を担持させた場合も、28 日目までの持続的な FGF-2 の溶出が認められた。さらに、FGF-2 担持ハイドロゲル粒子を浸漬した培地で MC3T3-E1 細胞の培養を行うと、その増殖が有意に促進された。また、FGF-2 担持ハイドロゲル粒子表面へは、細胞が十分に突起を伸ばして付着している様子が観察された。

実験 III：SB 硬化時の平均上昇温度は、室温下で約 1.3°C、37°C 下で約 2.5°C であった。SB 硬化体からは、 $2.2 \pm 1.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ の未重合 4-MET と $9.8 \pm 3.3 \mu\text{g}/\text{mL}$ の未重合 MMA の溶出が確認されたが、各モノマーをこれらの濃度で培地に添加しても、FGF-2 による有意な細胞増殖の促進と ALP 活性の上昇抑制が認められた。

【考察および結論】

BSA を用いた実験より、吸水によって試作ハイドロゲル粒子の表面にタンパクが吸着し、これらが水中環境下で持続的に溶出することが分かった。また、試作ハイドロゲル粒子に FGF-2 を担持させた場合も、活性を維持した状態で持続的な FGF-2 の溶出が生じることが

明らかになり、FGF-2 徐放性ハイドロゲル粒子の作製に成功した。さらに、FGF-2 を担持させたハイドロゲル粒子は細胞親和性にすぐれることができ確認された。一方、SB の重合による上昇温度はタンパクの変性を引き起こすほど大きくないこと、および、SB 硬化体から溶出する未重合モノマーの濃度は十分に低く、FGF-2 の機能に影響を及ぼさないことが分かった。

以上のように、本研究により、試作 polyHEMA 系ハイドロゲル粒子はタンパクの担持・徐放に適しており、成長因子である FGF-2 の徐放用担体として有用であることが明らかとなった。また、FGF-2 の活性への影響という点からは、FGF-2 徐放性ハイドロゲル粒子の 4-META/MMA 系レジンへの適用が可能であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、歯科用レジンへの適用を想定した polyHEMA 系ハイドロゲル粒子を新規に作製し、FGF-2 徐放用担体としての有用性の評価を行ったものである。

その結果、試作ハイドロゲル粒子はタンパクの担持・徐放に適しており、FGF-2 を担持させることにより、活性を維持した状態で FGF-2 の持続的な溶出が可能となることが明らかとなった。また、4-META/MMA 系レジンを対象とした場合、重合時の温度上昇や硬化体からの未重合モノマーの溶出は FGF-2 の機能に影響を及ぼすレベルではないことが分かり、FGF-2 徐放性ハイドロゲル粒子の適用が可能であることが示唆された。

以上の研究成果は、歯科用レジンに FGF-2 徐放性を付与するうえで有用な新規技術を提示するものであり、本研究は博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。