

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K06067

研究課題名(和文) エレクトロスピンニングによる骨再生用アパタイト被覆ポリ乳酸ナノファイバー足場の開発

研究課題名(英文) Development of PLLA nanofiber scaffold with apatite precipitation ability for bone regeneration by electrospinning

研究代表者

片山 傳生 (Katayama, Tsutao)

同志社大学・生命医科学部・教授

研究者番号：70161065

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、骨形成促進のためアパタイト析出の核として無水リン酸水素カルシウム(DCPA)粒子を添加した多孔質PLLA / DCPAファイバースキャホールドを開発した。PLLAとDCPAの混合比を5/1とし、エレクトロスピンニングにより多孔質PLLA / DCPAファイバースキャホールドを作製した。模擬体液(SBF)浸漬7日後、多孔質PLLA / DCPAファイバー表面はアパタイトで均一に覆われた。また、ファイバーを多孔質構造とすることで、ファイバー内部にもアパタイトが析出し、アンカー効果により剥離や割れのないアパタイト被覆が可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体吸収性材料であるポリ乳酸ファイバースキャホールドが移植後にアパタイトで被覆されるようにすることで、骨組織内の細胞微小環境を模倣し骨細胞の接着・増殖を活性化する機能を付与することが本研究の主要課題である。アパタイト形成の核となる無水リン酸水素カルシウム粒子の添加と、多孔質ファイバーの高い比表面により、割れや剥離なくファイバーが早期かつ均一にアパタイトで被覆されることを可能とした。生体内でファイバー表面がアパタイトで覆われることで、スキャホールド内部への早期の細胞遊走と骨分化を促進させることを可能とする多孔質PLLA/DCPAファイバースキャホールドの開発は社会的意義が大きいと考えた。

研究成果の概要(英文)：We developed the dicalcium phosphate anhydrous (DCPA) particle-doped porous PLLA (PLLA/DCPA) fiber scaffold, which has DCPA as the nucleus for apatite precipitation to accelerate bone formation. The ratio of PLLA and DCPA was 5/1, and the porous PLLA/DCPA fiber scaffolds were fabricated by electrospinning. The developed fiber scaffolds were immersed in simulated body fluid (SBF) for 7 days to evaluate apatite precipitates. Fiber surface of the porous PLLA/DCPA fiber scaffolds were covered early and uniformly with apatite after SBF immersion. Apatite was precipitated inside porous fibers due to porous structure, and porous PLLA/DCPA fiber scaffolds had uniform apatite precipitation without crack and exfoliation due to anchor effect. These results showed that the porous PLLA/DCPA fiber scaffold was expected to promote bone formation.

研究分野：材料工学

キーワード：ポリ乳酸 リン酸水素カルシウム ファイバースキャホールド アパタイト被覆 骨再生 エレクトロスピンニング

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

けがや病気による骨損傷のサイズが大きい場合、骨組織が本来もつ治癒能力には限りがあるため人工関節材料や骨置換材が広く使用される。骨は日常的に体重を支持する組織であるため、従来の骨置換材はその負荷に耐えうる強度・剛性を有するセラミクスや金属材料であった。しかし、セラミクスや金属材料では、複雑な骨欠損の形状に対応することは困難である。近年では、骨欠損の治療法として多孔質材料などのスキャホールドを用いた骨再生術が期待されている。しかし、患者の QOL の早期回復や医療費軽減の視点より患者の早期社会復帰を考えると、生体骨 - 生体材料間での骨再生をさらに短期間に行うという現実的な要求がある。このように生体骨に移植する骨組織再生用足場 (スキャホールド) に対する開発要求は非常に高い。

骨再生促進のためのスキャホールド開発における主要課題には、生体内から供給される間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化促進と骨芽細胞の活性化向上を生体骨の持つ生理学的特性より理解し、その特性を反映した再生促進機能を有するスキャホールドの開発にある。*in vitro* における実験観察より、骨細胞活性には骨置換材の表面粗さ、表面親水性、ポーラス径の調整が効果的であると数多く報告されている。このように、骨形成の活性化に關与する因子として、骨細胞 - 基質間接着の観点からも骨基質を模倣した微小細胞周囲環境の構築が重要と考えられる。申請者はこれまでナノファイバーに添加した圧電ナノ粒子により骨細胞活性と骨形成が促進されること、またナノファイバーをポーラス化することで細胞活性が維持されることを明らかとしてきた。ナノファイバーを用いて生体内環境を模倣するように細胞周囲環境を設計することは、細胞とスキャホールドとの相互作用を向上させ骨形成を促進することが期待される。

スキャホールドによる骨再生には、生体骨 - スキャホールド界面での骨形成を促す骨伝導性と、スキャホールド内部に骨形成を促す骨誘導性が重要となる。HAp や β -TCP は生体親和性が高く生体骨 - 材料界面での骨伝導性は優れるが、骨形成を促す骨誘導性が劣るため大きな骨欠損部での骨量増加を期待することは難しい。一方、生体吸収性ポリマーのナノファイバースキャホールドはその微細構造がナノオーダーの骨基質構造を模倣しており細胞接着性に優れ骨誘導性が期待されるものの、高分子の機械的特性が低く十分な力学特性を有する骨形成に時間を要するという問題がある。このように、生体親和性と力学特性に優れたスキャホールドを単独材料より作製することは困難であるため、力学特性に優れ早期に骨形成を促進するハイブリッドマテリアルによるスキャホールドの開発が期待されている。

骨再生を促進させる生体内環境を模倣するためには、骨基質成分で構成された骨組織のナノスケールの微細構造と類似したスキャホールド構造を創製する必要がある。ポリ乳酸の表面細胞接着性の改善と細胞活性を目的として、HAp 粒子を添加することで生体骨との接着促進が試みられている。しかし、粒子添加でのファイバー特性の改善においては、添加粒子はファイバー内部全体に分布し、表面近傍に集約されることはなく、添加粒子の骨形成への効果の制限は避けられない。本研究では、より効果的に骨細胞活性を促進させるようエレクトロスピンングで作製したナノファイバー表面がアパタイトで被覆される機能を付与し、ナノスケールの骨基質構造を模倣し骨再生機能を促進させることを試みる。このように、ナノファイバースキャホールドにアパタイト被覆が形成されることで生体骨のナノ構造を有する細胞微小環境を模倣した骨組織再生促進システムが完成すると考える。

2. 研究の目的

本研究では、骨再生術における人工骨 - 生体骨界面での骨伝導に加え骨誘導を促進するためのアパタイト被覆ポリ乳酸ナノファイバースキャホールドの開発を目指す。アパタイト析出の起点となる無水リン酸水素カルシウム (DCPA) 粒子を添加した生体吸収性ポリマーである PLLA をエレクトロスピンングにより繊維化し、生体内でファイバー表面がアパタイトで被覆されることで生体骨基質のナノ構造を模倣する。これにより間葉系幹細胞や骨芽細胞のスキャホールド内への侵入と活性を促すことで骨誘導を促進するとともにスキャホールド自体によるアパタイトの自発的誘導効果によって骨形成を飛躍的に向上させる骨再生用アパタイト被覆ポリ乳酸ナノファイバースキャホールドの創製技術開発を行う。

3. 研究の方法

(1) DCPA 粒子の作製

DCPA 粒子の作製には CaCl_2 と $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ を使用した。Ca/P 比が 1.0 となるように蒸留水 300 ml に CaCl_2 を 6.00 g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ を 19.38 g を溶かすことで溶液を調製した。その溶液をスターラーで 1 時間攪拌させることで反応させた後、副生成物として生成される NaCl を取り除くために蒸留水 300 ml で 2 回洗浄した。洗浄後、生成物を遊星ボールミルにより粉碎することで DCPA 粒子を作製した。X 線回折装置 (XRD) を用いて作製した DCPA 粒子の結晶構造を解析した。さらにレーザー回折式粒度分布測定装置を用いて作製した DCPA 粒子の粒度分布を測定した。

(2) 多孔質 PLLA/DCPA ファイバースキャホールドの作製

多孔質 PLLA/DCPA ファイバーを作製する手法にはエレクトロスピンング法を用いた。繊維径を 10 μm 以上とすることでマウス骨芽細胞様細胞 (MC3T3E-1) のスキャホールド内部への遊走、細胞の三次元的分布および活性の向上が報告されており、繊維径の目標値を 10 μm と設定した。また、PLLA ファイバーを多孔質化する手法には非溶媒素分離法に着目し、紡糸過程で大気中の

水分と PLLA 溶液との相分離を促進させるためにポリエチレンオキシド (PEO) を使用した。PLLA と PEO を溶剤である 1,3-dioxolane (DOL) に溶解させることで PLLA/PEO 溶液を調製した。PLLA/PEO 溶液濃度は 8 w/v%, PLLA/PEO 比率は 90/10 とした。DCPA 粒子の添加比率は PLLA の質量に対して 5/1 とした。また、PLLA ファイバーの多孔質構造がアパタイトの形成に与える影響を評価するために、中実 PLLA/DCPA ファイバーを作製した。中実 PLLA/DCPA ファイバーを作製するにあたり、PLLA 溶液濃度は 17 w/v% とし、DCPA 粒子の添加比率は PLLA の質量に対して 5/1 とした。

準備した各溶液をエレクトロスピンニング装置 (図 1) により紡糸することで、多孔質および中実 PLLA/DCPA ファイバースキャホールドを作製した。紡糸間距離を 200 mm とし、ターゲットにはφ9 の中空アルミ棒を用いた。吐出量を 100 μl/min, ターゲットの回転速度を 100 rpm, 印加電圧を 8.0-9.0 kV として 8 分間紡糸した。走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて作製したファイバースキャホールドの形態観察を行い、SEM 画像より繊維径を算出した。

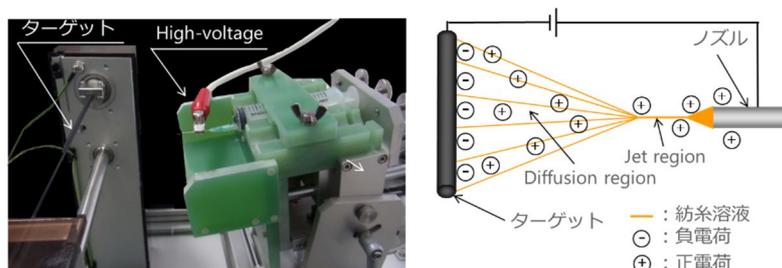


図 1 エレクトロスピンニングユニット

(3) 多孔質 PLLA/DCPA ファイバースキャホールドのアパタイト析出能評価

作製したファイバーの生体内でのアパタイト析出能を評価するために擬似体液 (Simulated Body Fluid: SBF) を調製した。SBF は生体内における人工材料表面のアパタイト析出能を評価する標準液として国際標準化機構 (ISO) に登録されている。Na⁺ 142 mM, K⁺ 5.0 mM, Mg²⁺ 1.5 mM, Ca²⁺ 2.5 mM, Cl⁻ 148.8 mM, HCO₃⁻ 4.2 mM, HPO₄²⁻ 1.0 mM, および SO₄²⁻ 0.5 mM となるように NaCl, NaHCO₃, KCl, K₂HPO₄·3H₂O, MgCl₂·6H₂O, CaCl₂, および Na₂SO₄ を蒸留水に溶かし、Tris (hidroxymethyl) aminometahne と 1 M の HCl を用いて SBF を調製した。

作製した多孔質および中実 PLLA/DCPA ファイバースキャホールドを 10×10 mm のシート状に成形した。各ファイバースキャホールドを 12 well plate の底面に設置した後、70%エタノール 2 ml に浸漬させた。エタノールを蒸留水と徐々に置換した後、デシケータを用いて脱気した。脱気した各ファイバースキャホールドを 10 ml の SBF に 37°C 環境下で 7 日間浸漬させた。なお、SBF は 1 日ごとに 5 ml 交換した。SBF 浸漬後、2 ml の蒸留水で 3 回洗浄することでファイバースキャホールド表面に付着した塩を除去し、凍結乾燥した。

SBF に浸漬した各ファイバースキャホールドについて、SEM による析出物の形態観察、エネルギー分散型 X 線分光器 (EDS) による析出物の組成分析、フーリエ変換赤外分光光度計 (FTIR) および XRD を用いて析出物の構造分析を行った。また、SBF 浸漬 7 日後の繊維径を測定し、SBF 浸漬前後の繊維径の変化を評価した。

4. 研究成果

(1) 多孔質 PLLA/DCPA ファイバースキャホールドの作製

XRD による作製した DCPA 粒子の結晶構造解析の結果、三斜晶系である DCPA に特徴的な回折パターンを確認した。粒度分布測定の結果、作製した DCPA 粒子のモード径は 1.148 μm, メディアン径は 2.193 μm であった。

SBF 浸漬前後の多孔質および中実 PLLA/DCPA ファイバースキャホールドの SEM 観察画像を図 2 に示す。多孔質 PLLA/DCPA ファイバーが多孔質構造となっていること、また多孔質および中実 PLLA/DCPA ファイバー表面に DCPA 粒子が分布していることを確認した。多孔質および中実 PLLA/DCPA ファイバースキャホールドの繊維径は、それぞれ 10.7±1.7 μm および 10.6±2.7 μm であった。

(2) 多孔質 PLLA/DCPA ファイバースキャホールドのアパタイト析出能評価

SBF 浸漬 1 日後には、多孔質および中実 PLLA/DCPA ファイバースキャホールドの表面に生体アパタイトに特徴的な鱗片状の析出物がみられた。SBF 浸漬時間の経過に伴って析出物は増加し、SBF 浸漬 7 日後には多孔質 PLLA/DCPA ファイバースキャホールドの表面が析出物で均一に被覆された (図 2)。SBF 浸漬 7 日後の中実 PLLA/DCPA ファイバースキャホールドの表面は概ね析出物で被覆されていたが、各所に析出物の割れおよび剥離がみられた。SBF 浸漬後の多孔質および中実 PLLA/DCPA ファイバースキャホールドの繊維径はそれぞれ 15.5±2.2 μm および 13.9±3.8 μm であり、析出物によりいずれの繊維径も増加していた。

SBF 浸漬 7 日後の多孔質 PLLA/DCPA ファイバースキャホールドの表面にみられた析出物の EDS による点分析の結果、O, Na, Mg, P, および Ca が検出された。定性的ではあるが P と同

様にファイバーに沿って O, Na, Mg, および Ca が均一に分布していることを確認した。また, 点分析結果より, Ca/P 比は 1.56 となり, HAp の Ca/P 比である 1.67 とほぼ同じ値を示した。SBF 浸漬前後における多孔質 PLLA/DCPA ファイバースキャホールドの FTIR 解析結果を図 3 に示す。SBF 浸漬後の多孔質 PLLA/DCPA において 961 cm^{-1} と 1025 cm^{-1} 付近に PO_4^{3-} に由来するピークがみられた。また, $1044, 1080, 1120, 1184, 1450$ および 1755 cm^{-1} 付近に見られる PLLA に由来するピークの強度は SBF 浸漬後に小さくなった。これは SBF 浸漬に伴ってファイバー表面が PO_4^{3-} を含む析出物で被覆されたことにより, スキャホールド表面において PLLA よりも析出物の量が相対的に多くなったためであると考えられる。SBF 浸漬前後の多孔質 PLLA/DCPA ファイバースキャホールドの XRD による結晶構造解析結果を図 4 に示す。SBF 浸漬前の多孔質 PLLA/DCPA ファイバースキャホールドにおいては $26.5^\circ, 30.1^\circ, 32.8^\circ$ 付近にピークがみられた。これらは三斜晶系である DCPA の (002), (210), および (022) に由来するピークである。SBF 浸漬 7 日後の多孔質 PLLA/DCPA ファイバースキャホールドにおいては, 25.9° および 31.8° 付近にピークがみられた。これらは六方晶系である HAp の (002) および (211) に由来するピークである。これらの結果から SBF 浸漬後にみられた析出物はアパタイトであること, また DCPA 粒子が SBF 中でアパタイト析出の核として機能することが確認された。

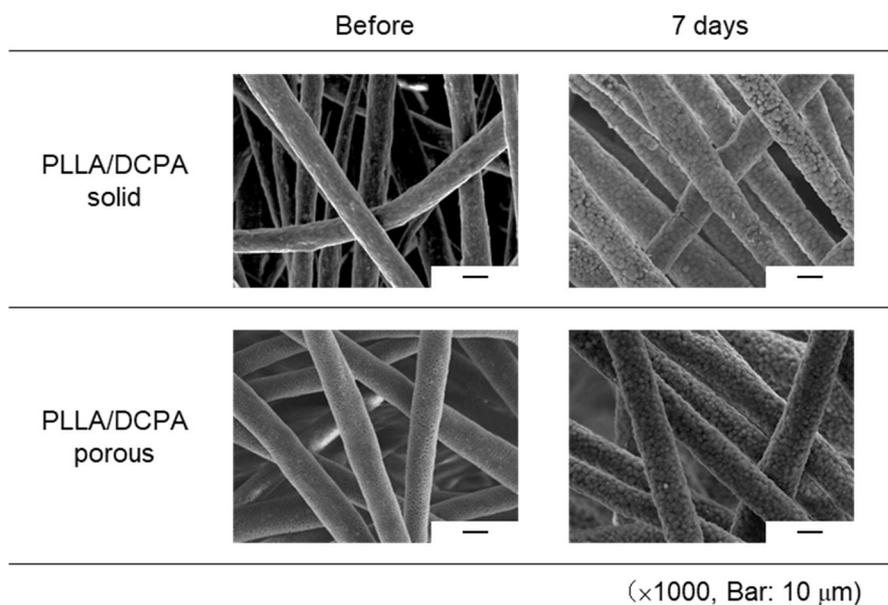


図 2 SBF 浸漬前後の各ファイバースキャホールドの SEM 観察画像

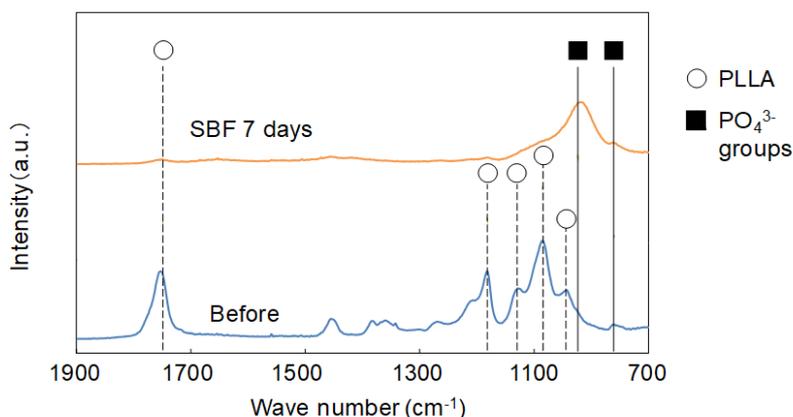


図 3 SBF 浸漬前後における多孔質 PLLA/DCPA ファイバースキャホールドの FTIR 解析結果

SBF 浸漬前後の多孔質 PLLA/DCPA ファイバースキャホールドにおけるファイバー断面の SEM 観察画像を図 5 に示す。SBF 浸漬前の多孔質 PLLA/DCPA ファイバースキャホールドにおいてファイバー内部まで連通した空隙を有していることを確認した。SBF 浸漬 7 日後において, ファイバーの内部においてもアパタイトの析出が確認され, 剥離のない均一なアパタイト被覆であることが確認された。SBF 浸漬後の中実 PLLA/DCPA ファイバースキャホールドの SEM 観察画像を図 6 に示す。中実 PLLA/DCPA ファイバースキャホールドではファイバー表面からアパタイトが剥離していることが確認された。多孔質 PLLA/DCPA ファイバースキャホールドでは, ファイバーの内部にもアパタイトが析出したことで, アンカー効果により剥離や割れのない均一なアパタイト被覆となったと考えられる。

これらの結果より、DCPA 粒子の添加比率を 5/1 とし、PLLA ファイバーを多孔質化することで、生体内において早期かつ均一にアパタイトで被覆されることが示唆された。

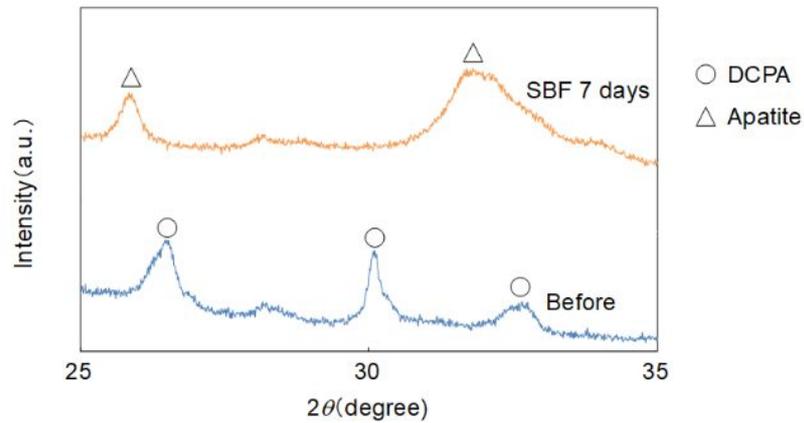


図 4 SBF 浸漬前後における多孔質 PLLA/DCPA ファイバースキャホールドの XRD 結晶構造解析結果

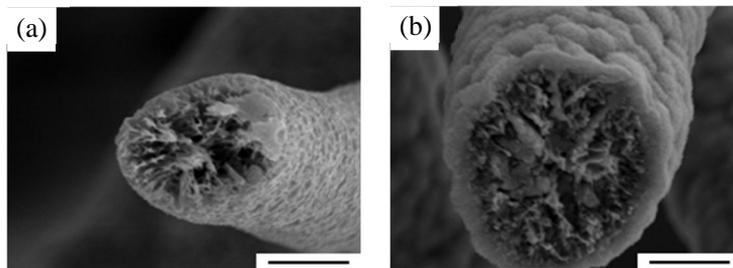


図 5 多孔質 PLLA/DCPA ファイバー断面の SEM 観察画像 (×5000, Bar: 5 μm). (a) SBF 浸漬前, (b) SBF 浸漬 7 日後.

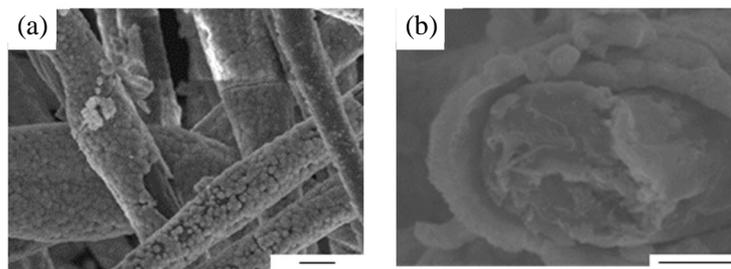


図 6 SBF 浸漬 7 日後の中実 PLLA/DCPA ファイバーの SEM 観察画像. (a) 表面 (×1000, Bar: 10 μm), (b) 断面 (×5000, Bar: 5 μm)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 松尾 陽之, 山本 浩司, 仲町 英治, 田中 和人, 片山 傳生, 森田 有亮
2. 発表標題 骨形成促進のための炭酸カルシウム粒子添加PLLAファイバースキャホールドの開発
3. 学会等名 第22回生体関連セラミックス討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松尾 陽之, 山本 浩司, 仲町 英治, 田中 和人, 片山 傳生, 森田 有亮
2. 発表標題 生体内でのアパタイト析出に優れた多孔質PLLA/DCPAファイバースキャホールドの開発
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松尾 陽之, 山本 浩司, 仲町 英治, 秋澤 康雄, 田中 和人, 片山 傳生, 森田 有亮
2. 発表標題 骨形成促進のためのアパタイト被覆PLLAファイバースキャホールドの開発
3. 学会等名 日本機械学会関西支部2017年度学生員卒業論文発表講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Haruyuki Matsuo, Koji Yamamoto, Eiji Nakamachi, Kazuto Tanaka, Tsutao Katayama, Yusuke Morita
2. 発表標題 Development of porous PLLA/DCPA microfiber scaffold to enhance bone formation
3. 学会等名 30th Annual Conference of the European Society for Biomaterial (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 多孔質体	発明者 森田 有亮, 松尾 陽之	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特許2019-026225	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	森田 有亮 (Morita Yusuke) (80368141)	同志社大学・生命医科学部・教授 (34310)	
研究 分 担 者	田中 和人 (Tanaka Kazuto) (50303855)	同志社大学・生命医科学部・教授 (34310)	