

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19791463

研究課題名（和文） 三次元構造を有するファイバー強化スキャフォールドの開発

研究課題名（英文） Development of fiber-reinforced scaffolds with three-dimensional structure

研究代表者

谷本 安浩 (TANIMOTO YASUHIRO)

日本大学・松戸歯学部・講師

研究者番号：40312045

研究成果の概要：本研究では、機能性と生体適合性に優れたスキャフォールド体を作製するため、凍結乾燥法を応用してポリ乳酸（PLA）ファイバーとハイドロキシアパタイト（HAp）の複合体（PLA/HAp 複合体）を作製した。また作製した PLA/HAp 複合体について *in vitro* における挙動などを評価・検討した結果、アパタイト生成能や細胞接着性に優れることから、新規スキャフォールド体として有用であることが示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	390,000	3,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴理工系歯学

キーワード：スキャフォールド、ポリ乳酸ファイバー、ハイドロキシアパタイト

1. 研究開始当初の背景

一般的に、骨の支持や欠損補填、骨形成を促進するための人工組織再生用足場（Scaffold: スキャフォールド）材料として、ハイドロキシアパタイト $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ や第三リン酸カルシウム $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$ などのリン酸カルシウム系セラミックス材料が用いられている。

従来、リン酸カルシウム系セラミックス材料をスキャフォールド材料として使用する際、主に多孔質体が使用されている。しかしながら気孔径あるいは気孔率が大きくなると多孔質体の機械的強度は著しく低下するため、体内埋入時あるいは埋入後早期に体内

で破壊する恐れがある。そのためセラミックス材料の脆性を改善して、機械的性質に優れるとともに高い生体適合性を有した生体材料の開発が必要である。

そこで研究代表者は、スキャフォールド材料の強度向上のために、優れた引張強度を有し、生体吸収性高分子材料である PLA ファイバーに着目した。さらに凍結乾燥法を応用することで、コラーゲンをバインダとして PLA ファイバーと HAp などのリン酸カルシウムとを複合化して、機械的性質と生体適合性に優れた三次元スキャフォールドを作製することを考えた。

2. 研究の目的

本研究では、機能性と生体適合性に優れ、三次元構造を有するスキャフォールド体を開発するため、凍結乾燥法を応用することでポリ乳酸（PLA）ファイバーとハイドロキシアパタイト（HAp）を複合化した PLA / HAp 複合体を作製するとともに、その作製した PLA / HAp 複合体について特性評価を行なうことが目的であった。

3. 研究の方法

(1) PLA / HAp 複合体の作製

HAp 粉末（図 1）とブタ皮膚由来の 1% Type I コラーゲン溶液（pH=3.0）を重量比 1 : 2 の割合で混合し、2 種類のメノウボール（3.0mm と 5.0mm）と一緒に遊星型ボールミルを用いて回転数 120rpm で 30 分間混合・分散した。これにより HAp 粒子表面の電荷を調整し、二次凝集粒子を解粒した。調製した HAp

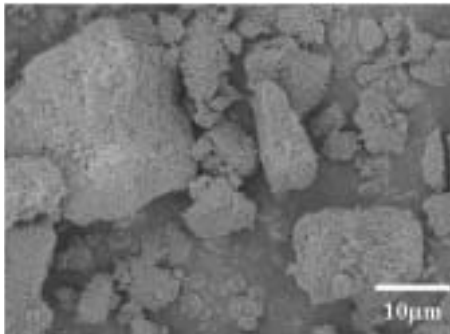


図 1 使用した HAp 粉末

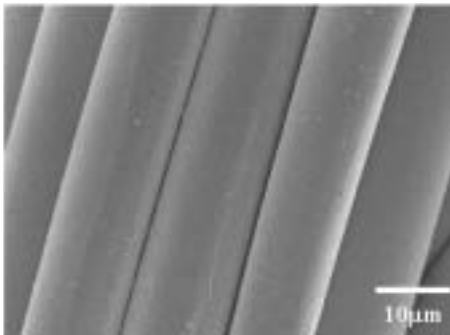


図 2 使用した PLA ファイバー

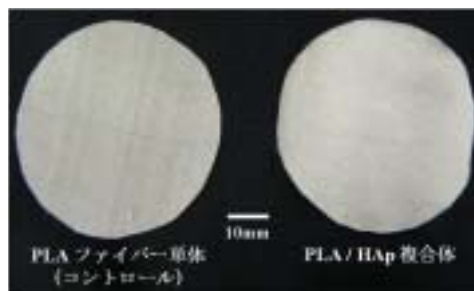


図 3 作製した PLA / HAp 複合体の外観

- コラーゲン複合スラリーをステンレス製シャーレ（50mm）に注入した後、コラーゲンを中和してゲル化させるために pH 緩衝液（HEPES, pH=7.4）を 10% 添加するとともに、PLA ファイバー（図 2）をスラリー中に速やかに含浸させた。その後 37 °C で 24 時間静置することで完全にゲル化させた。さらに -80 °C で 48 時間予備凍結した後、凍結乾燥機を用いて真空中にて -52 °C で 48 時間凍結乾燥を行なうことで、PLA ファイバーと HAp とを複合化した、シート状の PLA / HAp 複合体を作製した（図 3）。

(2) 作製した PLA / HAp 複合体の特性評価

電界放射走査電子顕微鏡（FE-SEM）による構造観察

PLA / HAp 複合体の表面構造を明らかにするために、試料表面にイオンコーターにより白金蒸着を施し、FE-SEM を用いて加速電圧 5kV で PLA / HAp 複合体表面の観察を行なった。

薄膜 X 線回折（TF-XRD）による構造分析

PLA / HAp 複合体の結晶構造を分析するために、TF-XRD 法を用いて電圧 40kV、電流 30mA、CuK α 線にて入射角 1° の条件で PLA / HAp 複合体の結晶の同定を行なった。

重量変化率の測定

生体内における PLA / HAp 複合体の溶解性および安定性を明らかにするために、PLA / HAp 複合体をポリスチレン容器中にて 15ml のリン酸塩緩衝液（pH=7.4, 37 °C）に 14 日間浸漬した。リン酸塩緩衝液は毎日新しいものに交換した。重量変化率は浸漬前後の重量から算出した。なお比較対象として HAp を複合化していない PLA ファイバー単体についても同様に浸漬試験を行なった。試験体数はそれぞれ 6 とした。

擬似体液浸漬試験によるアパタイト生成量の評価

生体内におけるアパタイト生成量および生成速度を明らかにするために、PLA / HAp 複合体をポリスチレン容器中にて 15ml のハンス溶液（pH=7.4, 37 °C）に浸漬した。浸漬期間は 24 時間および 7 日間とし、ハンス溶液は毎日新しく交換した。浸漬後の PLA / HAp 複合体は蒸留水にて洗浄しデシケータ中で乾燥した後、FE-SEM を用いて表面観察を行なった。なお比較対象として PLA ファイバー単体についても同様の浸漬試験を行なった。

細胞初期付着試験

細胞初期付着試験では 2×10^4 cells/ml の骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 を PLA / HAp 複合体上に播種し、24 時間後の細胞動態を観察した。培養液は MEM に 5% FBS および 1% のペニシリンを添加した培地を用いた。

4. 研究成果

本研究において凍結乾燥法を用いることで PLA ファイバーと HAp を複合化した PLA / HAp 複合体を作製することができた (図 3)。この複合体はシート状で柔軟性に富んでいた。また作製した PLA / HAp 複合体について FE-SEM により観察した結果、コラーゲンがバインダの役割を担うことで、PLA ファイバーと HAp 粒子が結合している様子が確認できた (図 4)。また PLA / HAp 複合体表面の TF-XRD 測定の結果、 $2\theta = 25.56^\circ$ と 31.60° にアパタイトに由来するピークが確認できた (図 5)。このことから、PLA ファイバーと HAp が均一に複合化していることが確認できた。

PLA / HAp 複合体をリン酸塩緩衝液に 14 日間浸漬した後の重量変化率は、 $-9.2 \pm 1.2\%$ であった。一方、コントロールである PLA ファイバー単体の重量変化率は $-0.8 \pm 0.3\%$ であり、PLA / HAp 複合体に比べて、その溶解性は約 1/10 であった。これは HAp を複合化していない PLA ファイバー単体に比べ、PLA / HAp 複合体の場合は、HAp とコラーゲンがリン酸塩緩衝液中にて溶解・分散したためと考えられる。

また生体内でのアパタイト生成挙動を明らかにするためにハックス溶液に 24 時間および 7 日間浸漬した後の PLA / HAp 複合体表面

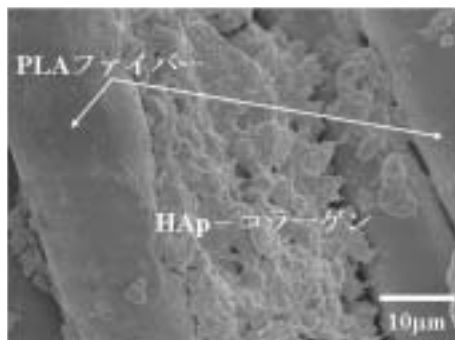


図 4 PLA / HAp 複合体の構造

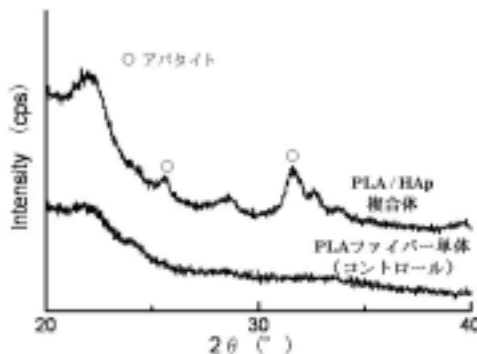
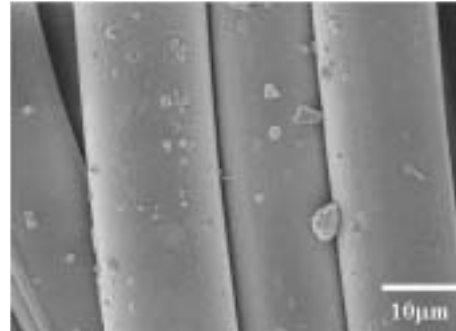
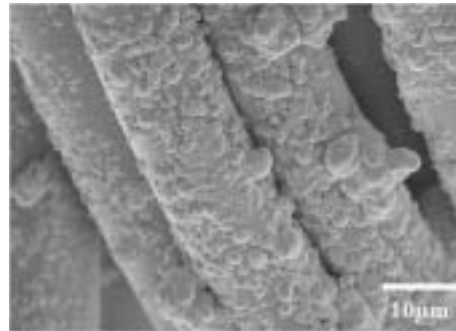


図 5 PLA / HAp 複合体の TF-XRD

面の FE-SEM 像を図 6 および図 7 にそれぞれ示す。浸漬 24 時間後では、コントロールである PLA ファイバー表面には結晶生成物はほとんど見受けられないのに対して、PLA / HAp 複合体の表面には、多くのアパタイト結晶が生成していた (図 6)。また浸漬 7 日後についても PLA / HAp 複合体表面の方がコントロールよりも多くの結晶が堆積していることが確認できた。

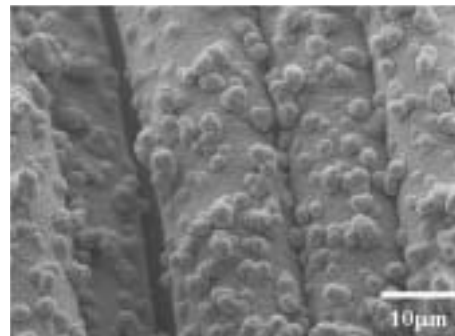


PLA ファイバー (コントロール)

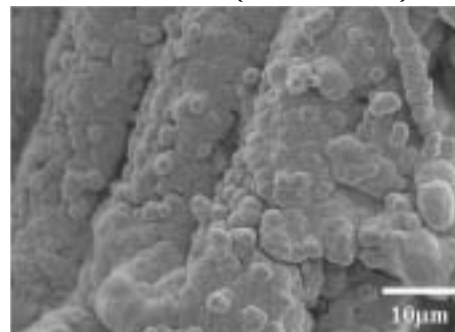


PLA / HAp 複合体

図 6 ハックス溶液浸漬 24 時間後の FE-SEM 像

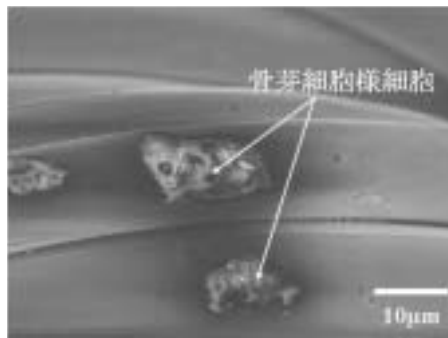


PLA ファイバー (コントロール)

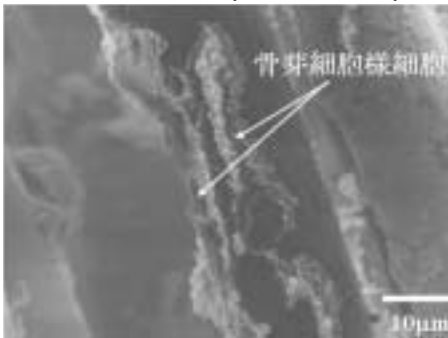


PLA / HAp 複合体

図 7 ハックス溶液浸漬 7 日後の FE-SEM 像



PLA ファイバー (コントロール)



PLA / HAp 複合体

図8 播種 24 時間後の細胞動態

さらに骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) 播種 24 時間後の PLA / HAp 複合体表面にはコントロールに比べ、細胞が大きく伸展している様子が確認でき (図 8)、細胞初期付着性に優れていた。

以上のことから、本研究において凍結乾燥法を応用することで、機能性に優れる生体吸収性の PLA ファイバーと生体活性に優れる HAp とを複合化した PLA / HAp 複合体は、柔軟性があるため操作性に優れるとともに、アパタイト生成能や細胞初期付着性にも優れることから新規スキャフォールド体として有用であることが示唆された。今後はエレクトロスピニング法を用いて種々の性質を有したナノファイバーを創製し、それを応用したスキャフォールド体の作製などを行なう予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 2 件)

谷本安浩、柴田陽、片岡有、宮崎隆、西山典宏、テープキャストによるハイドロキシアパタイト / 第三リン酸カルシウム複合体の作製と特性評価、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2008、2008 年 11 月 17 日、東京

Yasuhiro Tanimoto, Yo Shibata, Yu Kataoka, Takashi Miyazaki, Norihiro Nishiyama, *In vitro* behavior of tape-cast biphasic calcium phosphate ceramics, The 86th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research, 2008 年 7 月 3 日、トロント・カナダ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷本 安浩 (TANIMOTO YASUHIRO)

日本大学・松戸歯学部・講師

研究者番号：40312045