

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 11 日現在

機関番号：37114

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893284

研究課題名(和文) 骨伝導性と加工性を調和させた網目状構造を有する新規骨再生用足場材の創製

研究課題名(英文) The effect of a novel porous scaffold with a three-dimensional network structure on osteoconductivity and handleability

研究代表者

荒平 高章 (Arahira, Takaaki)

福岡歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：30706958

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：骨再生医療分野では、人工骨による移植の需要が年々高まっており、種々の多孔質人工骨が骨補填材として研究されている。リン酸三カルシウム(β -TCP)は骨再生用の足場材として広く用いられ、ポリ乳酸(PLLA)は機械的強度を向上させることが可能である。したがって、本研究では骨再生用の足場材としてPLLAによる3次元網目状構造を多孔質 β -TCP足場材表面に導入した新規多孔質足場材を作製することを目的とした。作製した足場材は、PLLA膜を導入することにより、力学特性や細胞親和性を向上させた。

研究成果の概要(英文)：In the field of bone regenerative medicine, the need for artificial bone substitutes has been rapidly increasing, and various porous bioactive ceramics have been developed for use as bone substitutes. While materials such as β -tricalcium phosphate (β -TCP) have good osteoconductivity, poly(L-lactide acid) (PLLA) has been shown to have good mechanical and physical properties. Therefore, the primary aim of this study was to fabricate a porous β -TCP scaffold with a PLLA network structure (β -TCP/PLLA) for use in bone tissue engineering. It was found that β -TCP/PLLA scaffold improved good mechanical property and cell affinity.

研究分野：生体工学

キーワード：Scaffold β -TCP ポリ乳酸 骨再生 力学特性 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、骨再生医療は急速に進展しており、自家骨移植に代わり足場材による骨再生治療が行われている。しかし、生体骨の形状は個人差があり、ブロック骨移植では事前に移植部位に応じて成形する必要がある。骨再生治療には生体活性セラミックス(β -TCP)製の多孔質足場材が広く用いられているが、生体活性セラミックス(β -TCP)本来の脆性的性質により、成形加工が困難であり、微細な亀裂でもそれを起点として破壊が進行してしまうといった問題点がある。

上記問題に対応するために、生体活性セラミックス製多孔質足場材に生分解性高分子などをコーティングした足場材について多くの研究がなされている。申請者は、 β -TCP多孔質足場材にコラーゲンをコーティングすることによって、セラミックスの脆性的性質が改善され、操作性が向上し、破壊の進行を止めることができ、圧縮弾性率は未コーティングよりも約9倍も向上することを報告している。しかし、従来の β -TCP表面へのコーティング法では、 β -TCP部が被覆されてしまい、 β -TCPの持つ骨伝導性が阻害されてしまう問題点がある。

そこで、本研究課題では、以上の問題点を解決するために、「生体活性セラミックス(β -TCP)多孔体の骨格部に生体吸収性高分子を用いた網目構造膜で覆った、新規2相構造型足場材」の創製を目指す。

2. 研究の目的

生体吸収性高分子含有溶媒で生体活性セラミックス(β -TCP)多孔体をコーティングした後、コーティング膜表面に β -TCPを露出させることにより、力学特性の著しい向上と骨伝導性を融合させた新規2相構造型足場材の創製方法を確立する。具体的にはコーティング層中に網目状の空孔部を形成させて、セラミックス部を露出させることにより、骨伝導性を損なうことなく力学特性及び操作性にも優れた足場材を創製する。また、申請者が従来用いてきたコラーゲンは分解速度が速く、長期的な力学特性の担保が困難であるため、本研究では新たに生体吸収性高分子ポリ乳酸(PLLA)によるコーティング膜について検討する。コラーゲンよりも分解速度が遅い生体吸収性高分子によって、埋入初期の力学適合性を付与し、骨再生とともに生体吸収性高分子が吸収されていき、最終的には骨に置換される足場材となる。

3. 研究の方法

3.1 β -TCP scaffoldの作製

足場材の基材となる β -TCP scaffoldはテンプレート法を用いて作製した。5%ポリビニルアルコール溶液と α -TCP粉末を重量比50:50で混合させた混合溶液にポリウレタンスポンジを浸漬させ、余分な溶液を取り除いた後、室温にて乾燥させた。図1に示すよう

に、 α -TCP溶液を含むポリウレタンスポンジを電気炉内で400°Cに加熱することでポリウレタンスポンジを除去した後、1500°Cで α -TCPを焼結し、その後900°Cで熱処理を行い α -TCPを β -TCPに相転移させることにより、 β -TCP scaffoldを作製した。作製したscaffoldにおいて、 α -TCPが β -TCPに相転移していることを、粉末X線回折(XRD)にて測定を行い、確認を行った。

3.2 β -TCP/PLLA scaffoldの作製と評価

作製した β -TCP scaffoldにPLLAをコーティングした。塩化メチレンにPLLAを0.5、0.7、2.0wt%で溶かし、その溶液に β -TCP scaffoldを含浸させ、余剰液を取り除いた後、乾燥させた。乾燥後、試料を圧縮試験、SEM観察にて評価した。また、コーティングをしていない β -TCP scaffoldについても同様の実験を行い、比較検討した。

3.3 β -TCP/PLLA scaffoldを用いた間葉系幹細胞培養結果

作製したscaffoldにラット骨髄由来間葉系幹細胞を 1.0×10^5 cells/scaffoldとなるように播種し、インキュベータ内で1時間静置させた後、増殖用培地(α -MEM, 10%FBS, 1% penicillin-streptomycin)を添加し、1日間前培養を行った。翌日、培地を骨芽細胞分化サプリメントを増殖用培地に添加した分化誘導培地と交換し、培養を開始した。細胞培養の一定期間ごとに試料を採取し、試料内のALP活性をプレートリーダーを用いて測定した。さらにFE-SEMによる表面観察を行い、細胞の増殖形態について評価を行った。

4. 研究成果

4.1 β -TCP/PLLA scaffoldの評価

まず、作製したscaffoldが α -TCPから β -TCPに相転移していることをXRDにて解析を行った。その結果を図1に示す。参考として、 α -TCP、 β -TCP粉末のXRDパターンも示している。測定結果より、熱処理を行った粉末は、 α -TCPの回折パターンから β -TCPの回折パターンに変化しており、 β -TCPに相転移していることが確認できた。図2に作製したscaffold表面のSEM画像を示す。 β -TCP scaffoldは骨格部表面は滑らかであり、いずれのscaffoldにおいてもポリウレタンスポンジの持つ多孔質構造を再現していた。コーティングするPLLA濃度を変えることによってコーティング層の形態が異なっている。PLLA濃度0.5wt%では表層にPLLAが繊維状構造をとっているが、表層のコーティングは不十分であることが確認できる。また、2.0wt%では、表層がPLLAによって被覆されており、円孔構造は確認されるが、 β -TCPは確認することができなかった。一方、PLLA濃度0.7wt%では、全体にわたって網目状構造を有するコーティング層が確認できた。図3に、作製したscaffoldの圧縮試験の結果を示す。コー

ティング濃度を変化させることによって、圧縮弾性率も変化することが確認できた。特に、表層が完全に被覆されている 2.0wt%では、他の濃度に比べ、約 10~14 倍の弾性率となった。

以上の結果より、PLLA の濃度を変えることによってコーティング層の構造を変化させることが可能であることが示唆される。この網目状構造によって、セラミックス部を露出させることによって、 β -TCP の持つ骨伝導性、細胞親和性、生体親和性を損なうことなく、さらにコーティング層によって力学特性・操作性の向上効果が期待できる。また、構造安定性も向上するため、移植部位における力学的適合性獲得も期待できる。

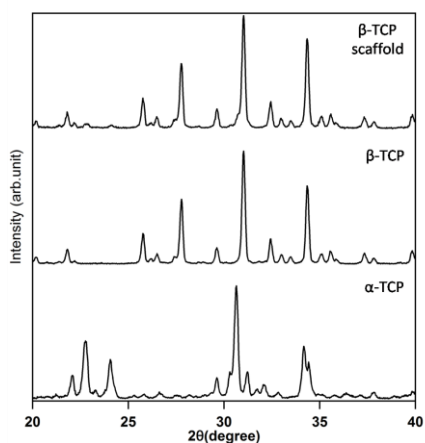
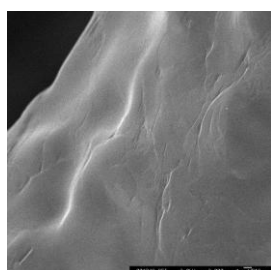
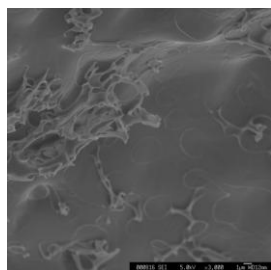


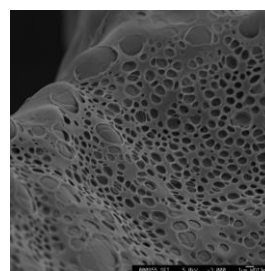
図 1. 作製した β -TCP scaffold の粉末 X 線パターン。



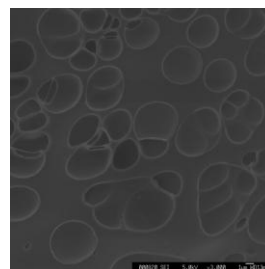
(a) original



(b) 0.5 wt% PLLA coating



(c) 0.7 wt% PLLA coating



(d) 2.0 wt% PLLA coating

図 2. FE-SEM による scaffold の表面構造観察。

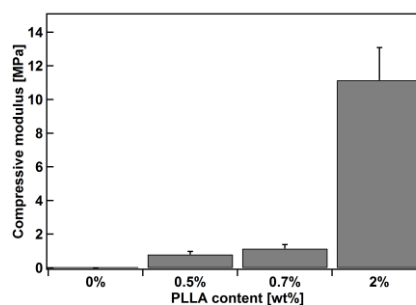


図 3. 圧縮弾性率。

4.2 β -TCP/PLLA scaffold を用いた間葉系幹細胞培養結果

図 4 に細胞培養後に測定した ALP 活性について示す。結果より、網目構造が全体にわたって構築されていた 0.7wt%において 4 週にわたって高い ALP 活性値を維持していた。1 週ではすべての PLLA 濃度群で差異は認められなかったが、2 週以降で、0.7wt%が高い活性値を示していた。次いで、2.0wt%よりも 0.5wt%の方がわずかに高い活性値を示した。これは、 β -TCP 表層が PLLA で完全に被覆されているために、 β -TCP の持つ骨芽細胞分化能効果が他の濃度に比べて PLLA 層に阻害されていたことが示唆される。

次に、細胞培養後 1 週における材料表面での細胞増殖挙動観察結果を図 5 に示す。培養 1 週で 0.7wt%、2.0wt%において表面での細胞増殖、細胞外マトリクスの旺盛な形成が認められた。特に、図 6 に示すように、0.7wt%では、細胞および細胞外マトリクスが盛んに観察された。一方で、0.5wt%では、細胞の接

着は認められるものの、他の濃度に比べ、増殖挙動や細胞外マトリクス形成は劣っている様子が示唆された。また、0.5wt%では、表層の PLLA 膜が図中では確認できなかったことから、培地浸漬に伴い、表層の PLLA 膜が剥離してしまったことが考えられる。

以上の結果から、網目状構造を導入することによって、 β -TCP の持つ骨芽細胞分化能効果を有しつつ、PLLA 膜による力学特性向上効果及び、構造安定性効果を付与した新規多孔質 3 次元足場材の作製に成功した。

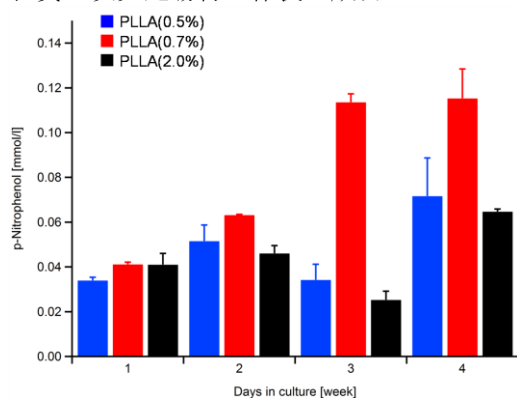
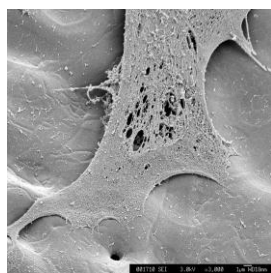
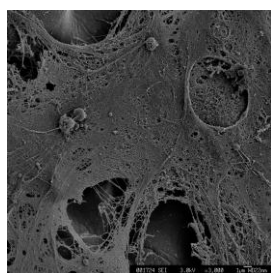


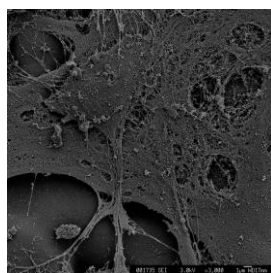
図 4. ALP 活性測定結果.



(a) 0.5 wt% PLLA coating.



(b) 0.7 wt% PLLA coating.



(c) 2.0 wt% PLLA coating.

図 5. Scaffold 表面での細胞増殖挙動観察 (培養 1 週後).

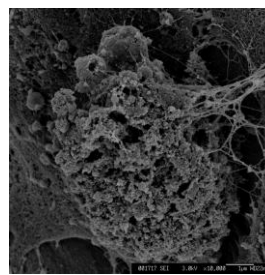


図 6. 0.7 wt% PLLA コーティング Scaffold 表面での細胞及び細胞外マトリクス(培養 1 週後).

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 件)

- ① T. Arahira, M. Maruta, M. Matsuya, M. Todo, Development and characterization of a novel porous β -TCP scaffold with a three-dimensional PLLA network structure for use in bone tissue engineering, *Materials Letters*, Vol. 152, 2015, pp.148–150. <http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2015.03.128>
- ② T. Arahira, M. Todo, Effects of osteoblast-like cell seeding on the mechanical properties of porous composite scaffolds, *Advanced Composite Materials*, 2015, pp.1-12. <http://dx.doi.org/10.1080/09243046.2014.942942>

[学会発表] (計 件)

- ① 荒平高章, 丸田道人, 松家茂樹, 東藤貢, 骨再生のための β -TCP/PLLA 複合系骨補填材の創製, 第 14 回日本再生医療学会総会, 横浜, 3 月, 2015 年.
- ② 荒平高章, 丸田道人, 松家茂樹, 東藤貢, 骨再生のための新規 β リン酸三カルシウム/ポリ乳酸複合系 scaffold の作製と評価, 日本機械学会第 27 回バイオエンジニアリング講演会, 新潟, 1 月 9–10 日, 2015 年
- ③ 荒平高章, 丸田道人, 松家茂樹, 骨再生のための新規 β -TCP/PLLA 複合系 scaffold の創製, 平成 26 年度秋期第 64 回日本歯科理工学会学術講演会, 広島, 10 月 4-5 日, 2014 年.
- ④ 荒平高章, 丸田道人, 松家茂樹, 東藤貢, 操作性・骨伝導性に優れる β -TCP/PLLA 複合系 scaffold の作製と基礎的評価, 第 25 回バイオフロンティア講演会, 鳥取, 10 月 3-4 日, 2014 年.

[図書] (計 0 件)

該当なし

[産業財産権]

○出願状況（計0件）
該当なし

○取得状況（計0件）
該当なし

〔その他〕
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒平 高章 (ARAHIRA, Takaaki)
福岡歯科大学・口腔歯学部・助教
研究者番号：30706958

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし