

機関番号：13903

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390497

研究課題名（和文） 骨再生歯科治療への応用を目的としたナノポーラスファイバーシートの創製

研究課題名（英文） Preparation of Bioresorbable Nanoporous Fibermats for Bone Regeneration in a Dental Field

研究代表者

春日 敏宏 (KASUGA TOSHIHIRO)

名古屋工業大学・工学研究科・教授

研究者番号：30233729

研究成果の概要（和文）：

骨形成を促進するケイ素イオンとカルシウムイオンが効果的に徐放される新しい生体吸収性材料として、シロキサン・ポリ乳酸・炭酸カルシウム複合材料を作製した。さらに電界紡糸法を用いて直径約 $10\mu\text{m}$ のナノポーラス構造を持つ繊維からなる $100\sim 200\mu\text{m}$ 厚の柔軟性のある不織布に成形した。細胞培養試験からこれらの設計は骨形成性細胞が三次元的に増殖できる場を提供するに好適であること、動物実験から骨形成に優れることを確認した。抜歯・脱落部の修復、顎骨部の炎症・腫瘍治療などに有効な骨再生誘導膜への応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：

Novel bioresorbable materials with silicate and calcium ions-releasing ability for enhancing bone formation were prepared using composites consisting of siloxane, poly(lactic acid) and calcium carbonate. They could be shaped into nonwoven fibermats of $100\sim 200\mu\text{m}$ -thickness, consisting of nanoporous fibers of $\sim 10\mu\text{m}$ in diameter. Cell culture tests showed that this dimensional design induced the 3D proliferation of bone-forming cells. The materials were confirmed by animal tests using rabbits to show excellent bone formation. They are expected to be applicable to membranes for guided bone regeneration in a dental field.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2009年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2010年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：材料科学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：骨再生誘導法、炭酸カルシウム、ポリ乳酸、アパタイト、電界紡糸法、ナノポーラス繊維、不織布、歯科治療

1. 研究開始当初の背景

近年急増している歯周病を原因とする抜歯・脱落部の修復、また顎骨部の炎症・腫瘍治療などの術式のひとつとして骨再生誘導法(BRP)が知られている。骨再建を待つ間、骨欠損部に骨形成に寄与しない細胞や組織

の侵入を防ぐため、障壁となる膜で欠損部を覆う方法である。

実用化されている膜材料としてポリテトラフルオロエチレンがあるが、欠損部の修復後に膜を取り除くための二次手術が必要である。一方、生体吸収性のポリマー、生物由

来コラーゲンや筋膜などの膜応用も報告されているが、機械的強度、細胞親和性、抗原性の問題など指摘されている。

筆者らは基盤研究B(14380398)で、ポリ乳酸にバテライト(炭酸カルシウム)を複合化することでその表面に生体吸収性炭酸含有アパタイトを迅速に生成させることができる(リン酸カルシウムを複合化するよりも数段早い)、成形が容易な生体活性材料を作製した。また、生分解性ポリマーにケイ素種を微量かつ効果的に徐放させるシステムを組み込むことで骨形成を促進させる材料を設計できることを示した。

このような材料を100~200 μ m厚の柔軟性のある膜に成形すれば、骨再生能を活性化する機能を有するGBR膜として大きな可能性につながる。つまり、現在使われているGBR膜は、骨再生のためのスペースメイキングにすぎないが、本材料はそれに加えて、積極的に骨再生を増進する役割を担うものとなる。

GBR膜へ応用する場合に最も重要な点は、軟組織侵入は防止するものの、栄養素の透過に十分な連通気孔を設ける必要があることと、膜の強度・柔軟性の確保である。

2. 研究の目的

筆者らの開発した有機無機複合材料を用いて、より確実な骨再生を期待できる歯科治療用吸収性の膜材料を作製し、その効果を確認することを目的とした。

(1) 細胞を刺激して骨形成を促進させる効果的イオンの徐放方法の開発

ケイ素イオンに着目し、骨形成に重要なカルシウムイオンとともに効果的に徐放される仕組みをもつ生体吸収性ハイブリッド材料を創製する。

(2) 複合材料のナノポーラス繊維化とこれを用いた不織布の作製

(1)の複合材料を100~200 μ m厚の柔軟性のある膜に成形する方法を開発する。不織布技術を利用して繊維シート化し、GBR膜などに最適な連通気孔と強度・柔軟性を確保する。繊維をナノポーラス化してイオン徐放性の制御を行う。

(3) 歯科治療への応用開発

(2)の繊維シートをGBR膜として応用することの優位性を細胞培養試験、動物実験により明らかにする。

3. 研究の方法

本研究でめざす素材は、ポリ乳酸(PLA)、シロキサン、炭酸カルシウム(バテライト)を複合したものとした。PLAの分解とともにケイ素種(ケイ酸)イオンが徐放され、バテライトの溶解により Ca^{2+} イオンが溶出するものである。膜の表面にはアパタイト層を被覆しておき、細胞親和性を向上させることとし

た。

GBR膜、骨充填剤、組織工学スキャホールドへの応用のため、栄養素の透過に十分な連通気孔を設け、かつ膜の強度・柔軟性を確保するため、不織布作製技術を用いて多孔質膜を作製した。

このために、電解紡糸法を採用した。高分子溶液に高電圧を印加することによって溶液をスプレーし、繊維を形成させるものであり、立体的な網目をもつ三次元構造の膜が得られる簡便・実用的な手法である。本研究では、意図的に太い繊維(10 μ m程度)からなる不織布とし、その繊維にイオン徐放性を制御するためのナノサイズの気孔を設けることとした。シートの強度と柔軟性、細胞の接着・増殖性、およびハイブリッドの溶解性を考慮したものである。

これらの設計指針に基づき、繊維の太さや繊維間で作られる空間(気孔)のサイズ、膜厚、イオン徐放量などを検討して細胞培養試験・小動物実験から、GBR膜などへ応用するために最適な微構造・形態を検討した。

4. 研究成果

(1) 骨形成を促進するイオン徐放性ハイブリッド材料の創製

ポリ乳酸(PLA)にシランカップリング剤(APTES)を化学的に結合させハイブリッド化する方法を検討した。固体核磁気共鳴法、赤外吸収分光により、シロキサンとしてポリ乳酸とアミド結合を介してハイブリッド化していることを確認した。溶液へのケイ素溶出量はポリ乳酸の分解に依存しており、極めて小さかった(<0.1ppm/day)。

一方、バテライト粒子を作製する際にAPTESを混在させておくと、得られる粒子にAPTES由来のシロキサンが混在できることを見いだした。このケイ素含有バテライト粒子をポリ乳酸と200 $^{\circ}$ Cで混練して複合体を作製するとその混合量によって徐放量を制御できることがわかった。0.5ppm/dayの徐放が可能であった。

(2) ナノ孔を有する繊維からなるシートの作製法の確立

上記の複合体を溶媒に溶かした液の粘度とその誘電率を調整して、電解紡糸法により、直径10 μ m程度の複合繊維からなるシートを作製する条件を見いだした。この繊維表面には溶媒の揮発した跡と見られるサブミクロンオーダーの気孔が多数生成することがわかった。細い繊維(直径数 μ m)ではこのような気孔を生成させることはできない。

ケイ素含有バテライト粒子を10~60%まで変化させて作製したポリ乳酸複合材料不織布(SiPVH)では、40%以上で脆性

的となり、30%で最も高い機械的引張強度を示した。引張によるエネルギーは粒子周りにわずかな体積膨張を引き起こし、高強度化したと思われる。バテライト30%の複合材料でも擬似体液中で繊維上にアパタイトが生成することを確認した。しかし、20%ではその生成は極めて遅かった。

柔軟性をあげるため、ポリ乳酸に変えてポリ乳酸/グリコール酸共重合体を用いて複合材料を作製したところ、作製まま材の伸びについては飛躍的に向上したものの、擬似体液浸漬3日で脆化に転じ、強度も著しく低下した。分子量の急速な低下が原因と考えられた。したがって、ポリ乳酸を用いることが最も好ましいと考え、SiPVH中のポリ乳酸の分子量を調べたところ、ゆっくりとした低下傾向が示され、好ましい生分解性を示すと期待された。

37°Cの擬似体液に1~3日間浸漬することにより、複合繊維上へ1 μ m程度のアパタイト層を生成させることができた。

(3) 複合材料の生体親和性評価

まず、上記の複合材料をフィルム状に成形し細胞培養試験により増殖性を評価した。ケイ素を微量に徐放する材料は、徐放しないものに比べて有意に増殖性が高いことを確認した。

直径10 μ m程度の繊維からなる不織布では計算では40 μ m以上の空隙が多数生成されることになり、細胞の進入を調べたところ、培養期間を延ばすにつれ、膜内部に進入・増殖することが確認された。一方、直径5 μ m程度の繊維からなる不織布では空隙のサイズは計算上10 μ m程度となり、細胞は三次元的には増殖できないことがわかった。

次に、不織布化した試料を骨再生誘導(GBR)膜として強度を確保するため、PLA単体膜との二層膜構造を部分プレスして作製した。得られた二層膜は、多孔性を維持した部分と繊維が密となった部分との両方をもつ形状であった。7日間MC3T3-E1細胞を培養したところ、繊維が粗な部分においては細胞が内部まで進入している様子が見られ、密な部分の周辺では比較的少量の細胞が表面に接着している様子が見られた。

繊維上での細胞接着は繊維同士のクロスリンクポイント周辺から始まる傾向が見られた。また、意図的に繊維間の空隙を塞ぐと、その部分での細胞の接着・増殖は抑えられたが、その周辺の空隙部分では旺盛な増殖が見られるようになった。部分的にこのようなプレスポイントを作ることによって細胞の挙動を制御できる可能性が示された。

家兎を用いた動物実験の結果、膜層内部

で旺盛な骨形成が見られ、骨欠損部への軟組織など骨形成に寄与しない細胞の侵入は観察されなかった。繊維表面にアパタイトを析出させたSiPVH層内にて石灰化組織の増加が観察された。

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15件)

①Hydroxyapatite Coatings Incorporating Silicon Ion Releasing System on Titanium Prepared by Using Water Glass and Vaterite, Akiko Obata, Toshihiro Kasuga, Julian R Jones, J. Am. Ceram. Soc., 査読有, accepted

②Modification and Mechanical Properties of Electrospun Blended Fibermat of PLGA and Siloxane-containing Vaterite/PLLA Hybrids for Bone Repair, Gowsihan Poologasundarampillai, Kie Fujikura, Akiko Obata, Toshihiro Kasuga, EXPRESS Polym. Lett., 査読有, accepted

③Effect of Preparation Route on the Degradation Behavior and Ion Releasability of Siloxane-Poly(lactic acid)-Vaterite Hybrid Nonwoven Fabrics for Guided Bone Regeneration, Takashi Wakita, Jin Nakamura, Yoshio Ota, Akiko Obata, Toshihiro Kasuga, Seiji Ban, Dental Mater. J., 査読有, 30, pp.232-238 (2011)

④Preparation of Electrospun Siloxane-Poly(lactic acid)-Vaterite Hybrid Fibrous Membranes for Guided Bone Regeneration, Takashi Wakita, Akiko Obata, Gowsihan Poologasundarampillai, Julian R. Jones, Toshihiro Kasuga, Composites Science and Technology, 査読有, 70, pp.1889-1893 (2010)

⑤Preparation of Siloxane-Containing Vaterite/Poly(lactic acid) Hybrid Fibermats with Improved Ductility for Bone Regeneration, Sen Lin, Kie Fujikura, Akiko Obata, Toshihiro Kasuga, J. Ceram. Soc. Japan, 査読有, 118, pp.623-625 (2010)

⑥Preparation of Siloxane-Containing Vaterite/Poly(lactic acid) Hybrid Beads by Electro spraying and HA-coating on Their Surfaces, Jin Nakamura, Akiko Obata, Toshihiro Kasuga, Phosphorus Res. Bull., 査読有, 24, pp.1-5 (2010)

⑦Preparation of Siloxane-Containing Vaterite/Poly(L-lactic acid) Hybrid Microbeads with Silicate and Calcium Ions-Releasing Ability, Jin Nakamura, Gowsihan Poologasundarampillai, Akiko Obata, Toshihiro Kasuga, J. Ceram. Soc.

Japan, 査読有, 118, pp.541-544 (2010)

⑧Electrospun Microfiber Meshes of Silicon-doped Vaterite/Poly(lactic acid) Hybrid for Guided Bone Regeneration, Akiko Obata, Toshiki Hotta, Takashi Wakita, Yoshio Ota, Toshihiro Kasuga, Acta Biomater., 査読有, 6, pp.1248-1257 (2010)

⑨Stimulation of Human Mesenchymal Stem Cells and Osteoblasts Activities *in vitro* on Silicon-Releasable Scaffolds, Akiko Obata, Toshihiro Kasuga, J. Biomed. Mater. Res., 査読有, 91A, pp.11-17 (2009)

⑩New Fabrication Process of Layered Membranes Based on Poly(lactic acid) Fibers for Guided Bone Regeneration, Takashi Wakita, Akiko Obata, Toshihiro Kasuga, Mater. Trans., 査読有, 50[7], pp.1737-1741 (2009)

⑪Preparation of Poly(lactic acid)/Siloxane/Calcium Carbonate Composite Membranes with Antibacterial Activities, Shingo Tokuda, Akiko Obata, Toshihiro Kasuga, Acta Biomater., 査読有, 5, pp.1163-1168 (2009)

⑫Enhanced *in vitro* Cell Activity on Silicon-Doped Vaterite/Poly(lactic acid) Composites, Akiko Obata, Shingo Tokuda, Toshihiro Kasuga, Acta Biomater., 査読有, 5, 57-62 (2009)

⑬Control of Silicon Species Released from Poly(lactic acid)-Polysiloxane Hybrid Membranes, Hirota Maeda, Toshihiro Kasuga, J. Biomed. Mater. Res., 査読有, 85A, pp.742-746 (2008)

⑭Cellular Compatibility of Bone-like Apatite Containing Silicon Species, Akiko Obata, Toshihiro Kasuga, J. Biomed. Mater. Res., 査読有, 85A, pp.140-144 (2008)

⑮Cellular Activity on Siloxane-Doped Poly(lactic acid)/Vaterite Composite Scaffolds, Akiko Obata, Toshihiro Kasuga, Key Eng. Mater., 査読有, 361-363, pp.399-402 (2008)

[学会発表] (計70件)

(以下には、主要なもの15件を記載)

①複合化による生体材料機能創製, 春日敏宏, 第58回日本金属学会・日本鉄鋼協会東海支部若手材料研究会「生体材料の進展」、名古屋(名古屋工業大学大会館3階0031講義室)、2011.1.25(依頼講演)

②Calcium Carbonate/Polymer Composites Releasing Silicon and Calcium Species for Biomaterials, Akiko Obata, Shinya Yamada, Julian R Jones, Toshihiro Kasuga, The 27th International Korea-Japan Seminar on Ceramics, Incheon, Korea, 2010.11.24-26

③シリコン種含有ポリ乳酸系ハイブリッド膜の細胞親和性評価, 竹内尚士、町頭三保、山下大輔、武内博信、宮本元治、春日敏宏、伴清治、野口和行、日本臨床歯周病学会平成22年度第1回九州支部教育研修会、福岡(福岡県歯科医師会館)2010.11.23

④カルシウム・ケイ酸イオン徐放型骨修復材料の作製, 中村仁、小幡亜希子、春日敏宏、伴清治、第56回日本歯科理工学会学術講演会、岐阜(長良川国際会議場)、2010.10.9-10

⑤シリコン種含有ポリ乳酸系ハイブリッド膜の生体適合性評価, 竹内尚士、町頭三保、山下大輔、春日敏宏、野口和行、伴清治、第55回日本歯科理工学会学術講演会、東京(タワーホール船堀)、2010.4.17-18

⑥二層構造を有するポリ乳酸系不織布膜中の細胞挙動, 山田真也、小幡亜希子、春日敏宏、日本セラミックス協会2010年年会、小金井(東京農工大学小金井キャンパス)、2010.3.22-24

⑦Siloxane-Poly(lactic acid)-Vaterite Hybrid Membranes Prepared by an Electrospinning Method, T. Kasuga, A. Obata, T. Wakita, Y. Ota, K. Oribe, 56th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, New Orleans, Louisiana, U.S.A., 2010.3.6-9

⑧Cell-Intercepting Ability of Electrospun Poly(lactic acid)-based Fibermats, K. Fujikura, A. Obata, T. Kasuga, 22th Inter. Symp. Ceramics in Medicine, Daegu, Korea, 2009.10.26-29

⑨Electrospun Fibrous Membranes Based on Poly(lactic acid) for Guided Bone Regeneration, A. Obata, T. Wakita, Y. Ota, T. Kasuga, 22th Inter. Symp. Ceramics in Medicine, Daegu, Korea, 2009.10.26-29

⑩Preparation of Silicon-Containing Poly(lactic acid)-Vaterite Hybrid Membranes, Akiko Obata, Takashi Wakita, Yoshio Ota, Toshihiro Kasuga, International Conference on Processing and Manufacturing of Advanced Materials 2009 (THERMEC'09), Berlin, Germany, 2009.8.25-28 (Invited Paper)

⑪シリコン種含有ポリ乳酸系ハイブリッド膜の生体適合性評価, 竹内尚士、町頭三保、山下大輔、宮本元治、武内博信、脇田剛誌、小幡亜希子、春日敏宏、野口和行、伴清治、平成21年度春期第53回日本歯科理工学会学術講演会、東京(タワーホール船堀)、2009.4.11-12

⑫骨再生誘導法への応用を目的としたポリ乳酸・炭酸カルシウム複合体不織布の作製, 小幡亜希子、脇田剛誌、太田義夫、春日敏宏、伴清治、平成21年度春期第53回日本歯

科理工学会学術講演会、東京（タワーホール船堀）、2009.4.11-12

⑬PLA/Vaterite Composite Microfiber Membranes for GBR, A. Obata, T. Hotta, T. Wakita, T. Kasuga, The IUMRS International Conference in Asia 2008, Nagoya, 2008.12.9-13

⑭Preparation of Layered Membranes Based on Poly(lactic acid) Fibers, T. Wakita, Y. Ota, A. Obata, T. Kasuga, 4th International Symposium on Designing, Processing and Properties of Advanced Engineering Materials, Nagoya, 2008.11.18-21

⑭細胞を活性化させるシリコン徐放型複合体材料の開発、小幡亜希子、春日敏宏、日本バイオマテリアル学会東北地域講演会・東北大学金属材料研究所共同研究ワークショップ「若手バイオマテリアル研究者の研究・開発動向」、仙台（東北大学金属材料研究所講堂）、2008.9.5（依頼講演）

〔図書〕（計2件）

①細胞組立可能な生体吸収性セラミック複合小球体の開発、春日敏宏、バイオマテリアル-生体材料、28[2]、日本バイオマテリアル学会、pp.103-108（2010）

②Nanoapatite Composite Scaffolds for Bone Regeneration (Chapter 9), T. Kasuga, A. Obata, H. Maeda, Handbook of Nanoceramics and Their Based Nanodevices Vol.5, edited by Tseung-Yuen Tseng and Hari Singh Nalwa, American Scientific Publishers, Stervenson Ranch CA 2009, pp.203-216（2009）

〔産業財産権〕

○出願状況（計7件）

①

名称:Material for filling bone defects and production thereof

発明者：T. Kasuga, H. Ozasa, A. Obata

権利者：名古屋工業大学

種類：特許

番号：13/074,790

出願年月日：平成23年3月29日

国内外の別：米国

②

名称：骨充填剤およびその製造方法

発明者：春日敏宏、山崎秀司、加藤且也、犬飼恵一

権利者：名古屋工業大学

種類：特許

番号：特願2011-056373

出願年月日：平成23年3月15日

国内外の別：国内

③

名称：Guided bone regeneration membrane

and manufacturing method thereof

発明者：T. Kasuga, A. Obata, K. Fujikura

権利者：名古屋工業大学

種類：特許

番号：12/876,665

出願年月日：平成22年9月7日

国内外の別：米国

④

名称：骨欠損部充填材料およびその製造方法

発明者：春日敏宏、小笹弘貴、小幡亜希子

権利者：名古屋工業大学

種類：特許

番号：特願2010-80139

出願年月日：平成22年3月31日

国内外の別：国内

⑤

名称:Material for filling bone defects and production thereof

発明者：Y. Ota, T. Kasuga, T. Wakita

権利者：矢橋工業株式会社、名古屋工業大学、山八歯材工業株式会社

種類：特許

番号：12/591,258

出願年月日：平成21年11月13日

国内外の別：米国

⑥

名称：骨再生誘導膜およびその製造方法

発明者：春日敏宏、小幡亜希子、藤倉喜恵

権利者：名古屋工業大学

種類：特許

番号：特願2009-208922

出願年月日：平成21年9月10日

国内外の別：国内

⑦

名称：骨欠損部充填材料およびその製造方法

発明者：春日敏宏、小幡亜希子、藤倉喜恵

権利者：名古屋工業大学

種類：特許

番号：特願2009-163320

出願年月日：平成21年7月10日

国内外の別：国内

○取得状況（計1件）

①

名称：高分子複合体粒子およびその製造方法

発明者：春日敏宏、前田浩孝、太田義夫、岩下哲志

権利者：春日敏宏、矢橋工業株式会社

種類：特許

番号：4447249号

取得年月日：平成22年1月19日

国内外の別：国内

〔その他〕

○報道関連

①春日敏宏：中日新聞『研究室発「布」で骨が自然に再生』(2009.12)

②春日敏宏: Materials Transactions
(Vol. 50 Issue 7)表紙に写真掲載 (2009. 6)

○受賞

①中村 仁: 第14回生体関連セラミックス
討論会 優秀発表賞 (2010. 12)

②中村 仁: 9th Asian BioCeramics
Symposiumu “ABC Award” (2009. 12)

③小幡亜希子: 第19回日本金属学会奨励賞
(材料プロセッシング部門) (2009. 9)

④小幡亜希子: IUMRS-ICA2008 優秀発表賞
(2008. 12)

○アウトリーチ活動

①春日敏宏: 日本セラミックス協会第16回
高校課題フォーラム開催 (2009. 8)

○ホームページ

<http://nitzy.mse.nitech.ac.jp/~kasugalab/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

春日 敏宏 (KASUGA TOSHIHIRO)
名古屋工業大学・工学研究科・教授
研究者番号: 30233729

(2) 研究分担者

伴 清治 (BAN SEIJI)
愛知学院大学・歯学部・非常勤講師
研究者番号: 10159105
小幡 亜希子 (OBATA AKIKO)
名古屋工業大学・工学研究科・助教
研究者番号: 40402656